

Aus der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Der Stellenwert des Sonic Hedgehog Signalweges bei neuroendokrinen Lungentumoren

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Joana Donata Regina Grups aus Würzburg

Marburg, 2020

*Für meine Eltern,
die mir alles in meinem Leben ermöglicht haben und
die stets an mich geglaubt haben.*

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

30.11.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: i.V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschbaum

1. Korreferent: PD Dr. Anja Rinke

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 ALLGEMEINES ZU DEN NEUROENDOKRINEN NEOPLASIEN	9
1.2 NEUROENDOKRINE TUMOREN DER LUNGE ALS UNTERGRUPPE DER NEUROENDOKRINEN NEOPLASIEN	10
1.3 KLINIK DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	12
1.4 DIAGNOSTIK DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	12
1.5 AKTUELLER THERAPEUTISCHER STAND DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	17
1.6 PROGNOSE UND THERAPEUTISCHE ERGEBNISSE DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	24
2 EPITHELIALE-MESENCHYMALE TRANSITION (EMT)	27
2.1 HINTERGRUND DER EMT	27
2.2 DER SONIC HEDGEHOG SIGNALWEG, PTCH 1 UND SMOOTHENED IN DER EMT	29
2.3 DIE BEDEUTUNG VON SNAIL 1 IN DER EMT	32
2.4 DIE BEDEUTUNG VON E-CADHERIN IN DER EMT	34
2.5 DIE BEDEUTUNG VON VIMENTIN IN DER EMT	35
2.6 DIE BEDEUTUNG VON TWIST IN DER EMT	36
3 FRAGESTELLUNG	38
4 PATIENTEN UND METHODEN	39
4.1 PATIENTEN MIT NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	39
4.2 IMMUNHISTOCHEMIE	41
4.2.1 Färbeprotokolle	42
4.2.2 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen	43
4.2.2.1 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Sonic Hedgehog Expression	45
4.2.2.2 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von PTCH 1	48
4.2.2.3 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von SMO	51
4.2.2.4 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Snail 1	54
4.2.2.5 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von E-Cadherin	57
4.2.2.6 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Twist	60
4.2.2.7 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Vimentin	63
4.3 WACHSTUMSSTUDIEN AN ZELLKULTUREN DER ZELLINIE CRL-5815	65
4.4 POLYMERASE KETTENREAKTION	66
5 ERGEBNISSE	67
5.1 UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE DER TUMOR-SIGNALWEGSEXPRESSION ALS MARKER BEI NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE	67

5.2	VERGLEICH DER ERGEBNISSE VON 4.2.2.1 BIS 4.2.2.7 AUFGESCHLÜSSELT NACH TYPISCHEN UND ATYPISCHEN KARZINOIDEN	70
5.3	WACHSTUMSVERHALTEN DER ZELLINIE CRL-5815 UNTER DEM EINFLUSS VON EMT SIGNALWEGS-INHIBITOREN.....	75
5.4	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE DER POLYMERASE KETTENREAKTION BEI DEN EMT SIGNALWEGEN DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DER LUNGE.....	79
6	DISKUSSION	83
6.1	EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODIK	90
6.2	AUSBLICK	90
7	ZUSAMMENFASSUNG	92
8	SUMMARY	94
9	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN MATERIALIEN	96
9.1	CHEMIKALIEN UND MEDIEN.....	96
9.2	REZEPTUREN FÜR SELBST HERGESTELLTE LÖSUNGEN UND MEDIEN	97
9.3	GERÄTE.....	97
9.4	GLAS- UND PLASTIKWAREN.....	99
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
11	TABELLENVERZEICHNIS.....	103
12	LITERATURVERZEICHNIS.....	104
13	LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	121
14	DANKSAGUNG.....	122

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
bzw.	Beziehungsweise
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AC	Atypisches Karzinoid
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AG	Antigene
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
CD 56	Neurales Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1)
CgA	Chromogranin A
Ci	Cubitus interruptus
CK	Cytokreatin
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EMTA	Epitheliale-mesenchymale Transition in der Embryonalzeit
evtl.	Eventuell
g	Gramm
GHRH	Wachstumshormon-Releasing Hormon
GLI 1	Glioma-associated-oncogene Homolog 1
GNRH	Gonadotropin-Releasing Hormon

Gy	Gray
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High-power field
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Ki-67	Proliferationsmarker
KM	Kontrastmittel
LK	Lymphknoten
mAK	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MIB-1	Cell Cycle Marker
min.	Minuten
ml	Milliliter
MNF116	Anti-Cytokeratin-Antikörper
mRNA	Messenger RNA (Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NE	Neuroendokrin
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokriner Tumor
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
NSE	Neuronenspezifische Enolase
o. g.	Oben genannt
OP	Operation
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PAS	Periodic Acid-Schiff
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Lösung aus PBS und 0,05 % Tween
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

prim.	Primär
R0	Kein Residualtumor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S2K	Konsensbasierte Leitlinie
s	Sekunden
sek.	Sekundär
SHH	Sonic Hedgehog
sog.	Sogenannt
SSTR2A	Somatostatinrezeptor Typ II
TBNA	Transbronchiale Nadelaspiration
TC	Typisches Karzinoid
TGF- β	Transforming-Growth-Factor Beta
Vim	Vimentin

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu den neuroendokrinen Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) umfassen eine Gruppe von Tumoren, die sich aus Zellen des neuroendokrinen Systems ableiten und ubiquitär im menschlichen Körper auftreten können. Ihren Ursprung finden sie in den Zellen des Endoderms und nicht wie früher angenommen in den Zellen der embryonalen Neuralleiste (Mayer & Schwarz, 2017).

Die Inzidenz der neuroendokrinen Tumoren (NET) wird mit vier bis sechs pro Hunderttausend Einwohnern geschätzt, wobei die Prävalenz deutlich höher ist, und mit 35 pro Hunderttausend Einwohnern angegeben wird (Yao *et al.*, 2008). Diese Raten sind in den letzten Jahren deutlich angestiegen, was aber vermutlich auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten (z. B. Computertomographie, Magnetresonanztomographie) zurückzuführen ist (Dasari *et al.*, 2017).

Für die Bundesrepublik Deutschland werden jährlich etwa 1300 bis 1600 neue Fälle erwartet. Davon betreffen etwa 400 bis 500 Fälle die Lunge, die nach dem Gastrointestinaltrakt, insbesondere dem Pankreas, die zweithäufigste Lokalisation dieser Tumoren ist (Kaifi *et al.*, 2015). Bei ca. 12,6 % der Fälle kann mit den zur Verfügung stehenden klinischen Methoden kein Organ als eindeutiger Entstehungsort identifiziert werden (Begum, 2017). Unabhängig von ihrer Lokalisation lassen sich die NET im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen, nämlich zum einen in den neuronalen Typ und zum anderen in den epithelialen Typ, der hauptsächlich den Verdauungstrakt und die Lunge betrifft.

Das mediane Alter bei der Erstdiagnose liegt bei etwa 59 Jahren mit einer Schwankungsbreite von 14 bis 93 Jahren. Ein signifikantes geschlechtsgebundenes Auftreten konnte bislang nicht festgestellt werden.

Prinzipiell wird zwischen hormonell aktiven und hormonell inaktiven NEN unterschieden. Etwa jeder 5. Tumor wird als funktionell hormonell aktiv eingestuft, wobei das sogenannte Karzinoidsyndrom am häufigsten auftritt (Halperin *et al.*, 2017). Früher wurden die neuroendokrinen Tumoren insgesamt als Karzinoide bezeichnet.

Dieser Begriff wurde 1907 von Oberndorfer erstmals geprägt, da man wegen ihres langsamen Wachstums davon ausging, dass es sich nur um Karzinom ähnliche und somit eher gutartige Tumoren handeln würde (Oberndorfer, 1907). Inzwischen ist aber klar, dass die NET sehr wohl maligne sein können und wie andere Karzinome in der Lage sind, zu metastasieren.

Am häufigsten (81 %) metastatisieren die NET in die Leber. Bei 19,8 % der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Lymphknotenmetastasen und bei 6,6 % sogar ossäre Metastasen diagnostiziert. Die Lunge wird in 3,9 % als Metastasierungsart genannt (Begum, 2017).

1.2 Neuroendokrine Tumoren der Lunge als Untergruppe der neuroendokrinen Neoplasien

Die neuroendokrinen Tumoren der Lunge sind relativ gesehen, eine seltene Tumorerkrankung. Ihr Anteil an der Gesamtzahl der Lungentumoren wird in der Literatur mit einer Schwankungsbreite von 1 bis 20 % angegeben, je nachdem, ob die sog. kleinzelligen Karzinome mit einbezogen werden (Kaifi *et al.*, 2015; Bonnichon *et al.*, 2010; Caplin *et al.*, 2015; Noel-Savina & Descourt, 2013). Anders als bei den übrigen Lungentumoren spielen der Nikotinkonsum oder andere bekannte Karzinogene bei der Tumorgenese der NET keine signifikante Rolle. Ihre Entstehung gilt nach wie vor als ungeklärt. Wie alle anderen Malignome werden auch die neuroendokrinen Lungentumoren nach der TNM-Klassifikation eingeteilt (Brierley *et al.*, 2016). Obwohl sich die Bezeichnung Karzinoid in der Medizin etabliert hat, reicht sie nicht aus, um das weite Spektrum der neuroendokrinen Tumoren sinnvoll zu erfassen (Klöppel, 2011). Dafür sind ihr klinisches Erscheinungsbild und ihre histologische Differenzierung zu weit gefächert. Wie in Tabelle 1 aufgelistet wird, werden neuroendokrine Tumoren der Lunge heutzutage in vier Subtypen unterteilt.

Einteilung der neuroendokrinen Tumoren der Lunge
1. Gut differenzierte, low grade Karzinoide (TC)
2. Gut differenzierte, intermediär grade, atypische Karzinoide (AC)
3. Schlecht differenzierte, high grade, großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC)
4. Schlecht differenzierte, high grade, kleinzellige Karzinome (SCLC)

Tabelle 1: Die Klassifikation der NET der Lunge in vier Subtypen (Travis et al., 2015).

Das großzellige neuroendokrine Karzinom (LCNEC) und das schlecht differenzierte kleinzellige Karzinom (SCLC) sind aber in ihrer Histologie und in ihrem biologischen Äquivalent nicht mit den TC und AC vergleichbar (Pelosi *et al.*, 2017).

Die Klassifikation der NET der Lunge, insbesondere die Abgrenzung von typischen Karzinoiden (TC) gegenüber atypischen Karzinoiden (AC), ist zum Teil sehr schwierig und wird von verschiedenen Kriterien bestimmt.

Zu diesen Kriterien gehören die Zellmorphologie, der Mitose-Index, das Wachstumsmuster und das Vorhandensein von Nekrosen. Der Ki-67 Mitose-Index kann zwar bei der Abgrenzung der TC und AC von den SCLC wertvolle Dienste leisten, aber die Unterscheidung zwischen den TC und den AC ist dennoch schwierig (Righi *et al.*, 2017). Die zwei entscheidenden Charakteristika, um TC von AC zu differenzieren, sind derzeit die Zahl der Mitosen pro 2 mm² und die An- bzw. Abwesenheit von Nekrosen (Hendifar *et al.*, 2017).

Auch mit Hilfe dieser beiden genannten Parameter ist eine Abgrenzung zwischen AC und TC aber nicht immer einfach. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn das Biopsie-Material starke Artefakte aufweist. Eine sichere Unterscheidung zwischen einem TC und einem AC ist aber wegen der klinischen Prognose und der sich daraus ergebenden therapeutischen Konsequenzen sehr wichtig, weshalb noch immer nach Wegen gesucht wird, um diese Differenzierung zuverlässig vornehmen zu können (Pelosi *et al.*, 2016).

1.3 Klinik der neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Bei den neuroendokrinen Lungentumoren stehen als klinische Symptome Husten mit 35 %, die bronchiale Obstruktion mit 40 % und Hämoptysen mit 25 % im Vordergrund (Kaifi *et al.*, 2015). Da die Lungenkarzinoide meist vom Bronchialsystem ausgehen, sind die klinischen Beschwerden hauptsächlich durch die Obstruktion des Bronchus bedingt und führen oft zu einer poststenotischen Pneumonie oder Atelektase. Bei manchen Patienten kommt es auch zur Fehldiagnose eines therapieresistenten Asthma bronchiale, die dann eine frühzeitige operative Therapie verzögert. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind aber trotzdem fast alle Lungenkarzinoide noch kleiner als 5 cm. Die Durchschnittsgröße beträgt 3 cm (Prosch, 2017).

Auch bei den NET der Lunge werden klinisch die funktionellen (hormonaktiven) von den nicht-funktionellen (hormoninaktiven) Tumoren unterschieden. Hormonell aktive NET in der Lunge bilden laut einer retrospektiven Studie von Vesterinen vor allem Serotonin, Calcitonin und ACTH (Vesterinen *et al.*, 2018). Diese funktionell hormonaktiven NET der Lunge sind aber mit einer Gesamtrate von weniger als 2 % sehr selten (Modlin *et al.*, 2003; Grimaldi *et al.*, 2011). Auf die Überlebensrate dieser Patienten hat die Hormonaktivität aber keinen signifikanten Einfluss.

Insgesamt machen die klinisch weitgefächerten Beschwerden der NET, abhängig von der Tumorart, eine individuelle Diagnostik notwendig, wobei die klinische Diagnose eines NET immer histologisch gesichert und möglichst leitliniengerecht klassifiziert werden sollte (Rinke *et al.*, 2018).

1.4 Diagnostik der neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Bei der Diagnostik der NET stehen vor allem die bildgebenden Verfahren Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Sonographie und die Positronen-Emissionstomographie (PET) im Vordergrund. Die CT mit Kontrastmittelgabe (KM) ist derzeit das beste Verfahren, um Karzinoide der Lunge inklusive ihrer extrabronchialen Ausdehnung und der mediastinalen Lymphknoten (LK) abzuklären.

Karzinoide verfügen in der Regel über eine Hypervaskularisierung und sind gut kontrastmittelanreichernd. Da in seltenen Fällen aber auch eine Hypovaskularisierung vorliegen kann, sollte sowohl eine arterielle als auch eine parenchymatöse Kontrastmittelserie angefertigt werden.

Eine PET-Untersuchung ist bei der Identifikation von Leber- und Skelettmetastasen hilfreich, wobei größere Lebermetastasen häufig nekrotisch sind (Sundin *et al.*, 2009).

Die PET-Untersuchung mit 68-Gallium markierten Somatostatin-Rezeptor-Liganden liefert dabei hervorragende Auflösungen (Steuer *et al.*, 2015). Sie hat deshalb auch als starker Konsens Eingang in die S2-Leitlinie gefunden (Rinke *et al.*, 2018).

Bei 20 % der TC liegt zwar eine Vergrößerung der LK im Mediastinum oder im Hilus-Bereich vor, diese sind aber größtenteils nur entzündlich reaktiv bedingt (Yamashita *et al.*, 2015; Granberg *et al.*, 2003). Ein Befall der mediastinalen LK ist somit beim TC selten und kommt hauptsächlich beim AC vor.

Die Gewebegewinnung zur histologischen Sicherung kann größtenteils durch eine Bronchoskopie erfolgen, da ca. 75 % dieser Tumoren zentral liegen. Da die Hälfte der AC bei der Diagnosestellung bereits die LK metastatisch befallen hat, kann eine transbronchiale und sonographisch gesteuerte Nadelaspiration (EBUS-TBNA) oder eine Mediastinoskopie erfolgen, um das Tumorstadium präoperativ zu sichern. Auch wenn die NET gut vaskularisiert sind, ist eine Blutungskomplikation mit 1 % dabei relativ selten. Die histopathologische Aufarbeitung aller NET sollte mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und einer Periodic Acid-Schiff Reaction (PAS-Färbung bzw. PAS-Reaktion) erfolgen, um eine möglichst exakte Abgrenzung bei der Unterscheidung zwischen gering differenzierten gegenüber hoch differenzierten Tumoren vornehmen zu können.

Da die Unterscheidung zwischen einem typischen und einem atypischen Lungenkarzinoid mit wichtigen therapeutischen Konsequenzen verbunden ist, wurden die verschiedensten immunologischen bzw. immunhistochemischen Verfahren getestet, um eine möglichst sichere Einstufung vornehmen zu können. Derzeit hat sich der Ki-67 Proliferationsindex bei der Klassifikation von TC und AC als besonders bedeutsam erwiesen (Warth, 2012). Allerdings kann der Ki-67-Index nicht als alleiniger unabhängiger Marker zur Klassifizierung herangezogen werden (Speel, 2016).

Die Grundlagen für die WHO-Klassifikation der Lungenkarzinoide wurden von Travis 2004 festgelegt und dann 2015 erweitert (Travis *et al.*, 2004; Travis *et al.*, 2015).

Zur besseren Übersicht wird nachfolgend die TNM-Klassifikation von 2012 der NET der Lunge in einer etwas vereinfachten Form dargestellt (Wittekind & Gradistanac, 2012).

Kurzfassung der TNM-Klassifikation neuroendokriner Tumoren der Lunge (2012)

Gruppierung der Stadien	
TX	Positive Zytologie
T1	Kleiner oder gleich 3 cm Größe
T2	Größer als 3 cm, Befall des Hauptbronchus weiter als 2 cm entfernt von der Carina, Invasion von viszeraler Pleura, partielle Atelektase
T3	Befall von Brustwand, Zwerchfell, Perikard, mediastinaler Pleura, Hauptbronchus, weniger als 2 cm von der Carina entfernt, totale Atelektase
T4	Befall von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Carina, Trachea, Oesophagus, Wirbelkörper, getrennte Tumorherde im selben Lappen, maligner Erguss
N1	Befall ipsilateraler, peribronchialer oder hilärer Lymphknoten
N2	Befall ipsilateraler, mediastinaler oder subcarinaler Lymphknoten
N3	Befall kontralateraler, mediastinaler, hilärer, ipsi- oder kontralateraler Skalenus- oder supraklavikulärer Lymphknoten
M1	Fernmetastasen, einschließlich getrennter Tumorherde in einem anderen Lappen

Tabelle 2: Kurzfassung der TNM-Klassifikation neuroendokriner Tumoren der Lunge (Wittekind & Gradistanac, 2012)

Diese Erweiterung bzw. Anpassung der TNM-Klassifikation war deshalb notwendig, da die Klassifikation von 2004 den klinischen Gegebenheiten oftmals nicht gerecht werden konnte. Bei dieser neuen Einteilung wurden die Besonderheiten der histopathologischen Erkenntnisse stärker berücksichtigt, die ihrerseits in enger Beziehung zur klinischen Prognose stehen.

Zum besseren Verständnis erfolgt nachfolgend eine vereinfachte tabellarische Auflistung der WHO-Klassifikation von 2015 nach Schnabel und Junker (Schnabel & Junker, 2015).

Erweiterte WHO-Klassifikation neuroendokriner Tumoren der Lunge von 2015

Tumortyp	Kriterien
Typische Karzinoidtumoren	Karzinoidmorphologie und < 2 Mitosen / 2 mm^2 (10 HPFs), keine Nekrose und $> 0,5 \text{ cm}$
Atypische Karzinoidtumoren	Karzinoidmorphologie mit 2-10 Mitosen / 2 mm^2 (10 HPFs) oder Nekrose (oft punktuell angeordnet)
Großzellige neuroendokrine Karzinome	Neuroendokrine Morphologie (organoide Strukturen mit trabekulären, rosettenförmigen oder palisadenartigen Strukturen)
	Hohe Mitoserate > 10 / 2 mm^2 (10 HPFs), im Median 70 / 2 mm^2
	Nekrose (oft große Regionen)
	Zytologische Eigenschaften von NSCLC: große Zellen, kleines Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma, einige Tumore weisen feines nukleäres Chromatin und fehlende Nukleoli auf, zählen jedoch aufgrund ihrer Zellgröße und ihres reichlichen Zytoplasmas zu den NSCLCs
	Positive immunhistochemische Markierung für ein oder mehrere NE-Marker (andere als NSE) und/oder neuroendokrine Granulae im Elektronenemissionsmikroskop
	Kleine Zellen (normalerweise kleiner als 3 Lymphozyten)

Tumortyp	Kriterien
Kleinzellige neuroendokrine Karzinome	Geringes Zytoplasma
	Nuklei: feines granuläres Chromatin, kleine oder matte Nukleoli
	Hohe Mitoserate: > 11 Mitosen / 2 mm ² (10 HPFs), im median 80 / 2 m ² (10 HPFs)
	Öfter Nekrosen, sehr häufig große Zonen

Tabelle 3: WHO-Klassifikation der NET der Lunge von 2015 (Schnabel & Junker, 2015).

Obwohl die NET der Lunge nur selten (< 2 %) hormonaktiv sind, sollte dennoch geklärt werden, ob ein klinisch manifestes Hormonsekretionssyndrom vorliegt und somit der Tumor funktionell aktiv ist (Prosch, 2017). Die Einstufung als hormonaktiver Tumor hängt davon ab, ob die Ausschüttung der hormonaktiven Substanzen zu klinischen Symptomen führt. Die alleinige Ausschüttung eines Hormons klassifiziert einen NET noch nicht als funktionell aktiv, sondern erst ein durch die Hormone klinisch ausgelöstes Syndrom. Die Differenzierung in funktionell aktive und nicht aktive NET hat eine weitreichende klinische Bedeutung, da dies unterschiedliche Therapien nach sich zieht. Der Anteil der funktionell inaktiven NET beträgt mehr als 50 %. Bei der Labordiagnostik muss die Bestimmung von Serotonin, Gastrin, Insulin sowie von 5-Hydroxyindolessigsäure im 24-Stunden Urin erfolgen. Der wichtigste Tumormarker ist aber das Chromogranin A (CgA), das bei mehr als 80 % der Patienten im Serum erhöht ist, und laut der S2-Leitlinie, bei allen NET bestimmt werden soll (Rinke *et al.*, 2018). Mit einer Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von 96 % ist es auch bei der Tumornachsorge ein wichtiger Parameter. Optional kann auch eine Untersuchung des Somatostatin-Rezeptors-2A (SSTR2A) erfolgen, bei dem es sich um den am häufigsten vorkommenden Somatostatin-Rezeptor handelt.

Der Wert der Tumormasse steht dabei in enger Korrelation zur Höhe des Chromogranin A-Spiegels im Serum und kann deshalb von Patient zu Patient stark schwanken (Oronsky *et al.*, 2017).

Die neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein Marker, der bei schlecht differenzierten NET zum Einsatz kommt. Da ca. 2 % der Lungenkarzinoide durch die Produktion von ACTH zu einem Morbus Cushing führen, ist auch die Bestimmung der 24-Stundenausscheidung von Cortisol im Urin sinnvoll. In seltenen Fällen können die NET der Lunge auch zu einer Akromegalie führen, was dann auf eine Produktion von GHRH zurückzuführen ist.

1.5 Aktueller therapeutischer Stand der neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Nach den Daten des 2003 als erstes europaweit gegründeten NET-Registers steht die Operation (OP) mit 73 % der Fälle als häufigste Therapieform im Vordergrund.

Die OP ist derzeit die einzige kurative Therapiemöglichkeit, wobei eine komplette Tumorentfernung (R0-Resektion) angestrebt werden muss. Die Lobektomie bzw. die Resektion entlang der anatomischen Grenzen sind dabei die chirurgische Therapie der ersten Wahl.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 1) zeigt das frische Operationspräparat eines typischen Karzinoids des linken Unterlappens mit dem Tumorstadium pT1c, pN0 (0/20), L0 V0 Pn0 R0. In der IHC-Färbung zeigte sich der Tumor positiv gegenüber CD56, Synaptophysin, Chromogranin A und Cytokeratin-Antikörper MNF116. Der Proliferationsindex Ki-67 lag bei 3,5 %. Es zeigten sich keine Tumornekrosen. Die Bronchus-Absetzungskante und die Gefäß-Absetzungskante waren tumorfrei.

In den Abbildungen 2 bis 5 werden die dazugehörigen Histologien desselben Präparates dargestellt.

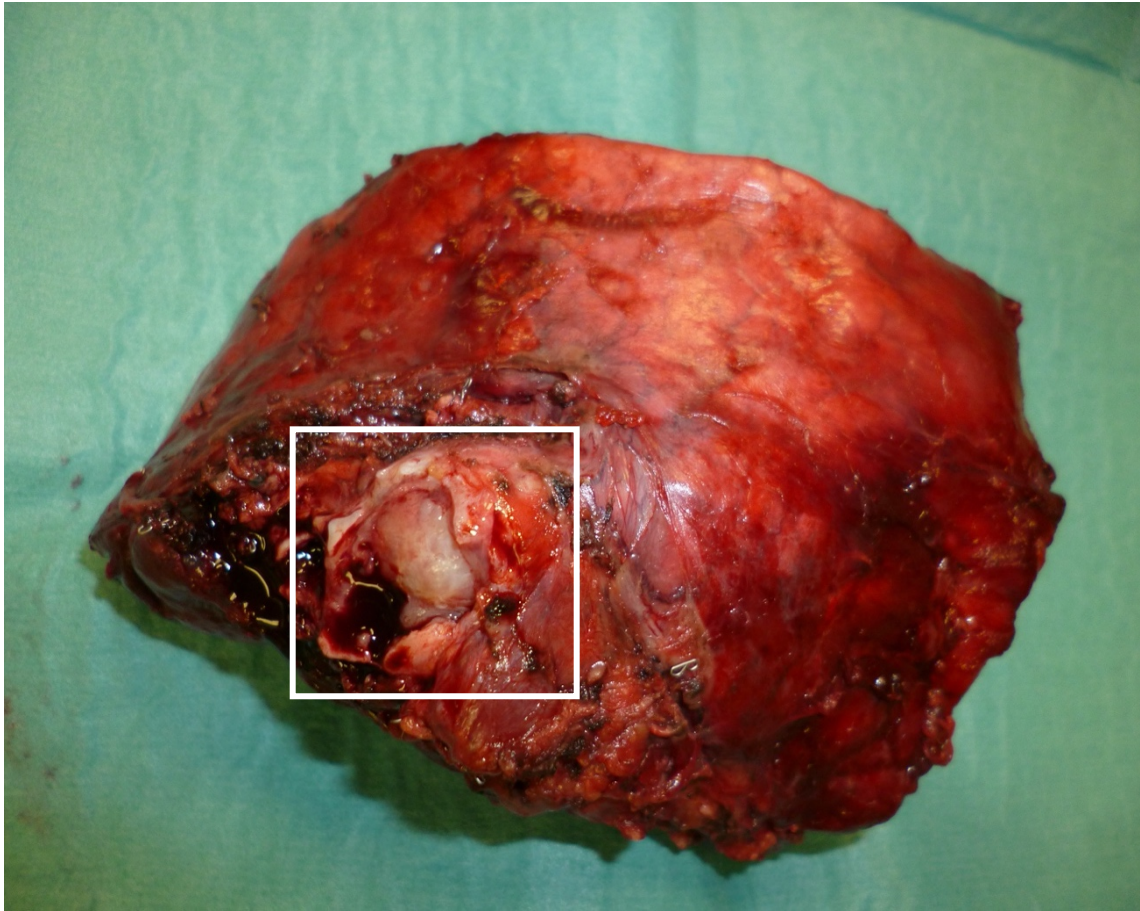


Abbildung 1: Frisches Operationsresektat des linken Lungenunterlappens eines 19-jährigen Mannes mit einem endobronchial lokalisierten 2,2 cm großen, soliden, trabekulär wachsenden Tumor. Die Morphologie und Immunhistochemie passen zu einem typischen Karzinoid (siehe Abb. 2 bis 5). Foto und Operationspräparat von Herrn Prof. Dr. A. Kirschbaum, Universitätsklinikum Marburg (UKGM) 2019.

In dem ersten histologischen Präparat (Abb. 2) sieht man am linken Bildrand die erfassten Bronchuswandanteile und zentral den soliden intraluminal gelegenen Tumor.

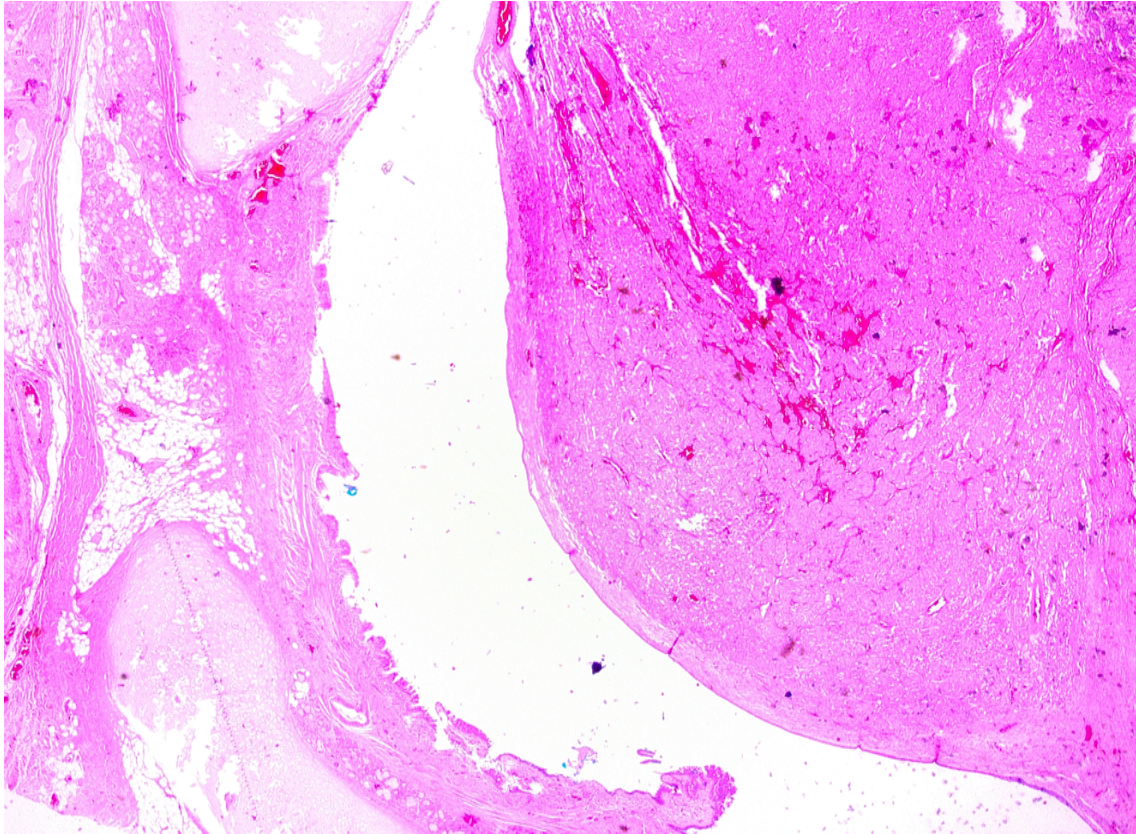


Abbildung 2: Histologisches Bild des in Abb. 1 dargestellten Tumors in der HE-Färbung in 12,5-facher Vergrößerung (Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Marburg).

Die Abb. 3 zeigt das histologische Bild des Tumors in einer stärkeren Vergrößerung (100-fach).

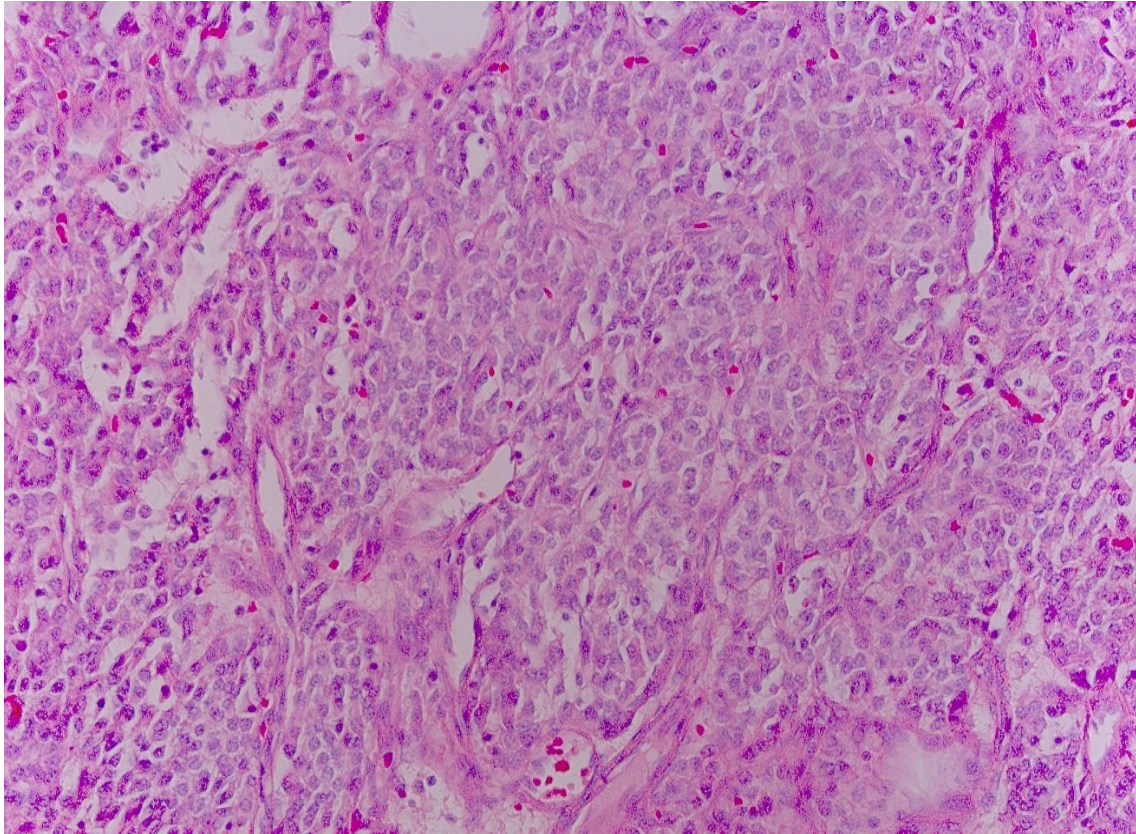


Abbildung 3: Histologisches Präparat des in Abb. 1 dargestellten Tumors nach der Anfärbung mit HE im Detail in 100-facher Vergrößerung (Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Marburg).

Die Abb. 4 zeigt die gegen das Antigen Ki-67 positiv angefärbten Zellen.

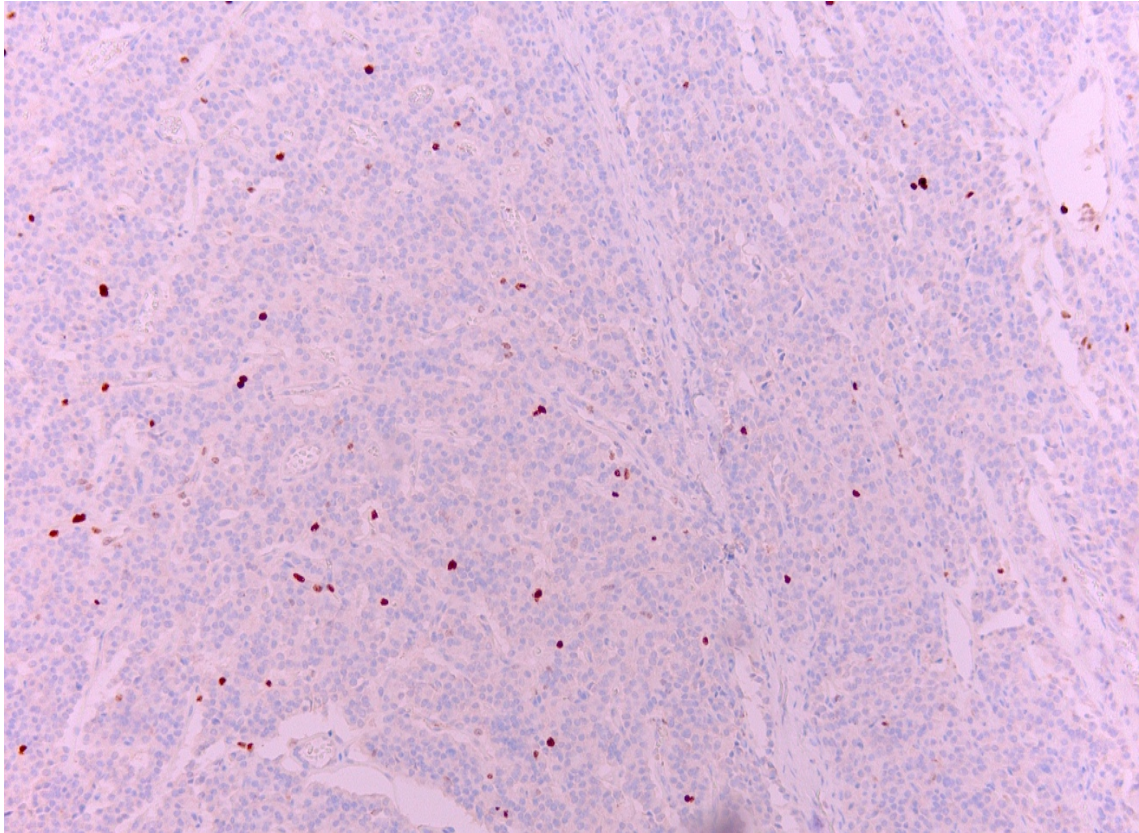


Abbildung 4: Histologisches Präparat des oben abgebildeten Tumors nach Anfärbung des Ki-67 Antigens auf der Zelloberfläche in 100-facher Vergrößerung (Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Marburg).

Die Abb. 5 zeigt die positive Anfärbung gegen den neuroendokrinen Marker Synaptophysin.

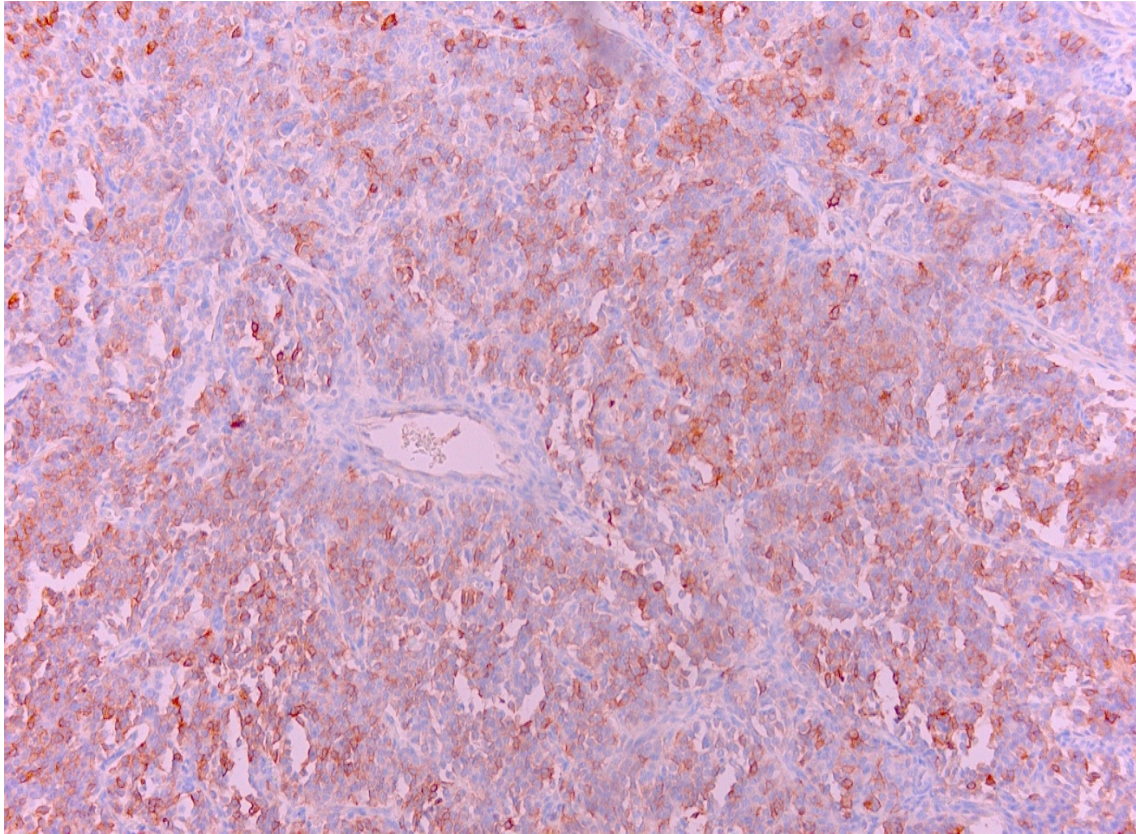


Abbildung 5: Histologisches Präparat des obigen Tumors nach IHC-Färbung gegen Synaptophysin in 100-facher Vergrößerung (Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Marburg).

Die Resektion von Metastasen sollte nach Möglichkeit immer mit dem Ziel einer kurativen Maßnahme erfolgen (Caplin *et al.*, 2015).

Wenn es gelingt, eine R0-Resektion durchzuführen, haben die Patienten mit einem TC eine statistische 10-Jahres Überlebensrate von ca. 80 %. Patienten mit einem AC haben hingegen nur eine 10-Jahresüberlebensrate von ca. 50 % (Rea *et al.*, 2007; Detterbeck, 2010; Cardillo *et al.*, 2004). Dies ist vor allem der hohen Rezidiv-Rate dieser Tumoren von mehr als 20 % geschuldet (Yuste *et al.*, 2017). 2018 wurde erstmals die S2K-Leitlinie zur Therapie gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren publiziert (Rinke *et al.*, 2018). Darin wurde festgelegt, dass nach einer erfolgreichen R0-Resektion keine adjuvante Therapie empfehlenswert ist (Rinke *et al.*, 2018). Dies lässt sich aber nach den klinischen

Erfahrungen wohl auch auf die NET der Lunge übertragen, da die S3K-Leitlinie zur Therapie des Lungenkarzinoms, das Lungenkarzinoid nicht berücksichtigt (Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, 2018). Während die operative Resektion der Lungenkarzinoide konsensuell als einziger kurativer Ansatz sowohl für TC als auch für AC unumstritten ist, wird das beste therapeutische Vorgehen bei den nicht resezierbaren Tumoren immer noch kontrovers diskutiert. Auch die Behandlung metastasierter NET ist bisher nicht einheitlich standardisiert. Die Chemotherapie und Radionuklidtherapie sowie die Interferontherapie erfolgen nur in 6,2 %, 3,6 % und 0,6 % als Erstlinientherapie (Hobbins *et al.*, 2016). In der Zweitlinie wird die Chemotherapie in 18 %, die Radionuklidtherapie in 19 % und die Interferontherapie in 6,5 % der Fälle durchgeführt. Beim fortgeschrittenen NET der Lunge sollte somit stets ein multidisziplinäres Vorgehen angestrebt werden, damit die Therapie individuell den Gegebenheiten des Patienten angepasst werden kann.

Da die NET der Lunge wesentlich schlechter auf eine Chemotherapie ansprechen als die NSCLC, kommt ihr Einsatz im Allgemeinen nur bei inoperablen Tumoren oder nach R1-Resektionen und bei Metastasen in Frage. Als gebräuchlichste Substanzen werden dabei aktuell Etoposid und Cis-Platin eingesetzt. Diese Therapie stützt sich auf eine Studie von Forde, der bei 18 Patienten eine Ansprechrates von 40 % beschrieb (Forde *et al.*, 2014). Die Wirkung der Chemotherapie ist aber bisher nicht durch größere prospektive Studien bestätigt worden. Es liegen somit gegenwärtig keine größeren randomisierten Studien dazu vor. Die publizierten Therapien stützen sich bisher meist auf einzelne Fallberichte (Wolin, 2015).

Ein neuer Therapieansatz, der erst vor wenigen Jahren in die Behandlung eingeführt wurde, ist der mTOR-Inhibitor Everolimus. Er ist als erstes Medikament in den USA zur Therapie fortgeschrittener TC und AC der Lunge zugelassen worden (Hendifar *et al.*, 2017). Everolimus konnte in der RADIANT4-Studie bei 63 Patienten die progressionsfreie Überlebenszeit von 3,6 Monaten in der Placebo-Gruppe auf 9,2 Monate in der Everolimus-Gruppe verlängern (Fazio *et al.*, 2018).

Die „Hazard Ratio“ bei fortgeschrittenen NET konnte damit um mehr als 50 % reduziert werden (Yao *et al.*, 2016; Fazio *et al.*, 2018). Nach der RADIANT 4-Studie von Yao wurde die Therapie mit Everolimus bei fortgeschrittenen NET in allen Subgruppen positiv bewertet (Yao *et al.*, 2016). Somit scheint diese Therapie eine wertvolle

Erweiterung des therapeutischen Spektrums bei metastasierten bzw. fortgeschrittenen NET der Lunge zu sein, obwohl derzeit weitergehende prospektive randomisierte Studien, in denen Everolimus in Kombination mit anderen Substanzen geprüft wird, noch nicht abgeschlossen sind (Pusceddu *et al.*, 2017).

Andere Therapieansätze wie Temozolomid, Sunitinib, Thalidomid und Bevacizumab befinden sich derzeit erst in klinischen Phase II oder III Studien und sind somit in ihrem zukünftigen Stellenwert noch nicht sicher zu beurteilen.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass sich aktuell diverse Checkpoint-Inhibitoren in verschiedenen klinischen Studienphasen befinden.

Die insgesamt schlechten therapeutischen Aussichten waren unter anderem Anlass dafür, um nach neuen Ansatzpunkten, wie z. B. den Tumorsignalwegen, für eine erfolgsversprechende Therapie zu suchen.

Eine Strahlentherapie ist ebenfalls nur bei fortgeschrittenen Tumoren in Erwägung zu ziehen und sollte dann mit 60 Gray (Gy) erfolgen. Sie ist in der Regel aber nur beim AC mit positiven Schnitträndern im Resektat, oder beim Vorliegen von mediastinalen Lymphknotenmetastasen sinnvoll. Somatostatin-Analoga wie Octreotid können dann zum Einsatz kommen, wenn die klinischen Symptome des Karzinoid-Syndroms bei fortgeschrittenen Tumoren das Ziel einer palliativen Therapie sind (Melosky, 2018; Yao *et al.*, 2016).

1.6 Prognose und therapeutische Ergebnisse der neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Laut einer Studie von Vesterinen sind sowohl die Tumorgöße als auch das histologische Erscheinungsbild zum Zeitpunkt der OP von erheblicher prognostischer Bedeutung für den Behandlungserfolg (Vesterinen *et al.*, 2018).

Anders als bei den NSCLC ist die Prognose bei den Lungenkarzinoiden relativ günstig. Sie ist aber, wie die Abb. 6 zeigt, bei den TC und den AC deutlich unterschiedlich. Die

5-Jahresüberlebensrate bei den TC beträgt 88 % und nach 10 Jahren beträgt die Überlebensrate immer noch 81 %.

Bei den AC sinkt die 10-Jahresüberlebensrate hingegen auf nur 59 % (Ramirez *et al.*, 2017).

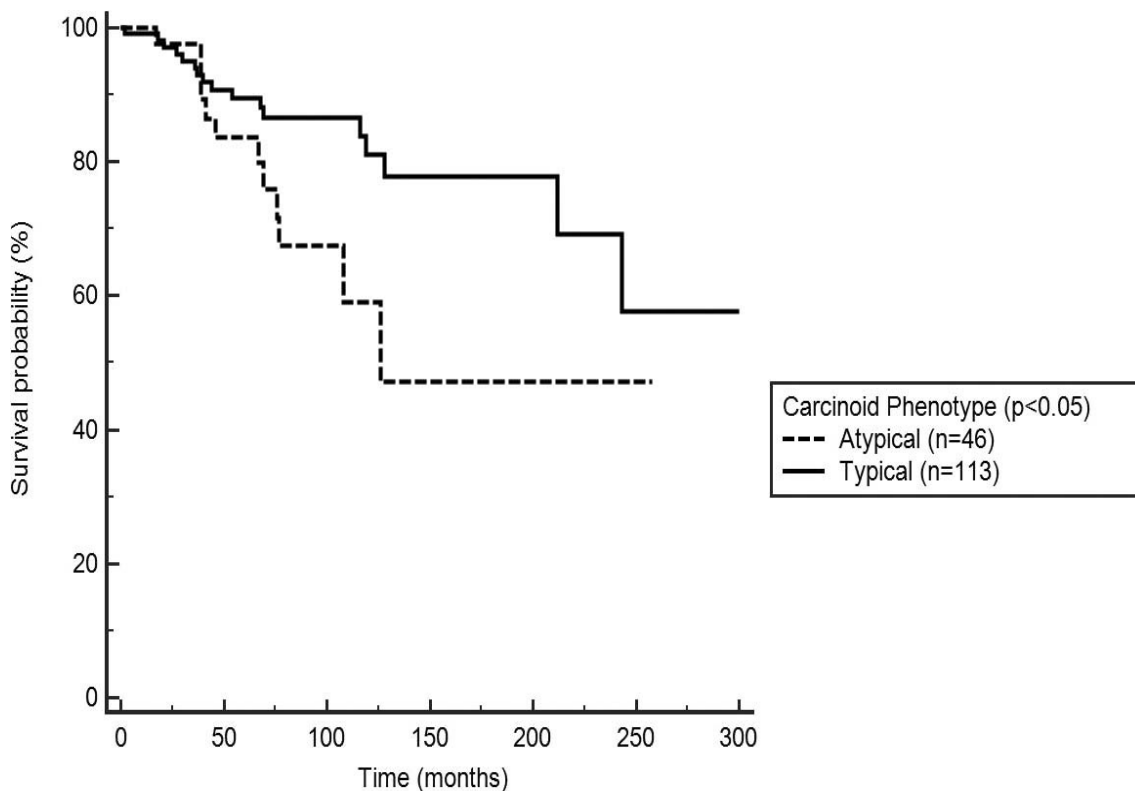


Abbildung 6: Kaplan-Meier survival curve for lung neuroendocrine tumors stratified by typical vs atypical carcinoid phenotype (n1/4159). Patients with atypical carcinoids had a poorer prognosis, with 10-year survival rates of 59% compared to 81% for typical carcinoids ($P < 0.05$) (Ramirez *et al.*, 2017).

Wie bei anderen Lungentumoren auch, sind die Tumorgröße und ein eventueller Lymphknotenbefall, so wie das Vorliegen von Fernmetastasen, prognostisch ungünstig. Bei einer Tumorgröße von mehr als 3 cm verschlechtert sich die Überlebensrate außerdem signifikant.

Vor allem aber der Ki-67-Index hat einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten mit einem NET.

Die Überlebensrate korreliert dabei nach verschiedenen Untersuchungen stark mit dem Ki-67 / MIB-1 Proliferationsindex (Warth, 2012). Das Antigen Ki-67 kann während der Mitose an der Zelloberfläche nachgewiesen werden, während es sich ansonsten im Zellinneren befindet. Patienten mit einem Ki-67-Index von mehr als 2,0 %, also einem hohen Proliferationsindex, haben eine deutlich schlechtere Prognose. Wie die Abb. 7 zeigt, liegt bei einem Ki-67-Index von $> 10\%$, die 10-Jahresüberlebensrate nur bei etwas über 20 %.

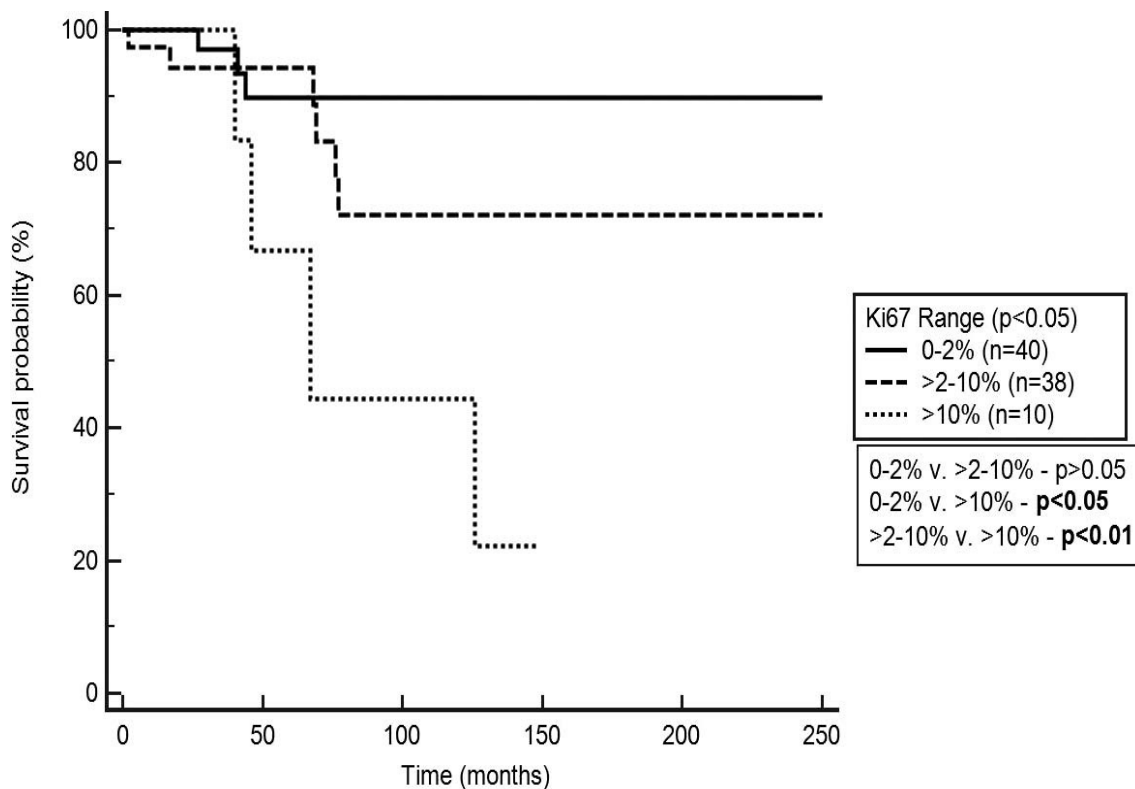


Abbildung 7: Kaplan-Meier survival curve for lung carcinoids stratified by Ki-67 proliferative index (n1/488). Patients with Ki-67 values $> 10\%$ had a significantly worse prognosis than patients with Ki-67 values $< 10\%$ ($P < 0.05$) (Ramirez et al., 2017).

Patienten mit Lymphknotenmetastasen haben laut einer US-Analyse von mehr als 5000 Patienten nur eine 5-Jahresüberlebensrate von 61 % (Horner, 2011). Die operierten

Patienten hatten dabei aber mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 82 % ein deutlich besseres Resultat, was den Stellenwert der OP unterstreicht.

2 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

2.1 Hintergrund der EMT

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) spielt sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in der gesamten Onkologie und somit auch bei den neuroendokrinen Tumoren der Lunge eine wichtige Rolle; sie bildet somit aber kein einheitliches Geschehen ab. Während der embryonalen Entwicklung ist die EMT ein normaler Vorgang und wird auch als EMT 1 bezeichnet (Kalluri *et al.*, 2010). Sie ist an dem kompletten Verlust der epithelialen Markerproteine beteiligt und steuert zum Teil die Knochenentwicklung. Im Bereich der Lungen spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Bronchialknospung. Ferner wurde kürzlich die Bedeutung der EMT bei der Entstehung der Lungenfibrose entdeckt (Giroux-Leprieur *et al.*, 2018).

Auch beim gesunden Erwachsenen spielt der Vorgang der EMT eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und der Geweberegeneration. Dieser Vorgang der EMT wird als EMT 2 klassifiziert.

In der Onkologie geht es aber um die EMT 3, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Epithelzellen ihre Adhäsionseigenschaften verlieren und sich in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften umwandeln. Dieser Vorgang wird durch zahlreiche Glykoproteine reguliert, die die Zell-zu-Zell Bindung steuern.

Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs stammt von Kalluri und wird hier in Abb. 8 wiedergegeben (Kalluri *et al.*, 2010).

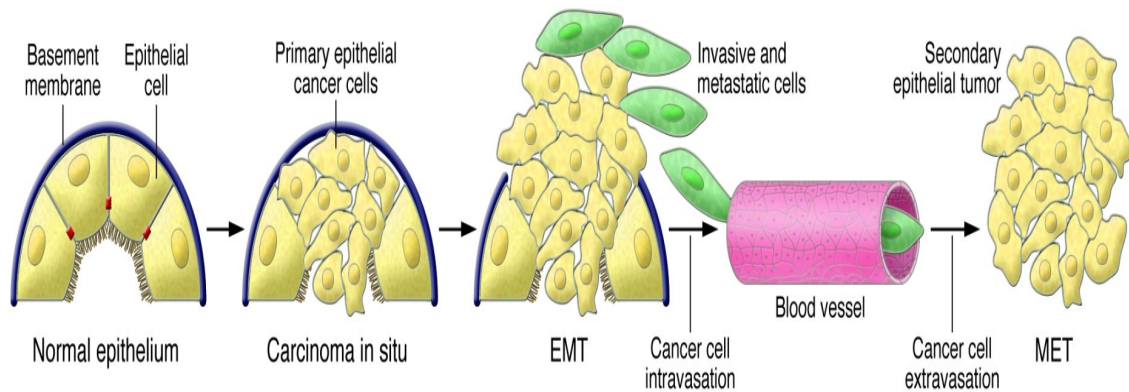


Abbildung 8: Progression from normal epithelium to invasive carcinoma goes through several stages (Kalluri *et al.*, 2010).

Wichtigster Vertreter dieser sogenannten Adhäsionsmoleküle ist das E-Cadherin, das bei der EMT herunterreguliert wird (Gheldof & Berx, 2013). Im Gegenzug werden mesenchymale Marker wie Vimentin hochreguliert (Kidd *et al.*, 2014).

Bei diesem Vorgang kommt es auch zu einem Verlust der zellulären Polarität, was eine Zellmigration und Zellwanderung begünstigt und die Zellen somit in die Lage versetzt, zu infiltrieren und zu metastasieren (Onder *et al.*, 2008). Auch die Entwicklung einer Resistenz gegen die Apoptose ist ein Teil der EMT 3.

Die Bedeutung der EMT bei der Metastasierung wird auch daraus ersichtlich, dass sich in vielen Tumoren eine sehr heterogene Krebszellpopulation findet (z. B. beim Mammakarzinom und beim Prostatakarzinom). Dies macht deutlich, dass vermutlich verschiedene Tumorvorläuferzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Transformation im Sinne der EMT durchlaufen (Heerboth *et al.*, 2015).

Der Verlust der Zelladhäsion und der Verlust der Zellpolarität sowie die zunehmende Instabilität des Zellskeletts sind dabei Schlüsselvorgänge, die zur Metastasierung bzw. Tumorinvasion führen können.

Die Metastasierung selbst wird durch weitere hochkomplexe biochemische Vorgänge gesteuert, bei denen unter anderem die Glykoproteine SHH, Snail 1, Twist, E-Cadherin, SMO und Vimentin wichtige Rollen als Signalgeber spielen (Roche, 2018). Ihre Expression bei den NET der Lunge soll hier untersucht werden.

Die EMT spielt aber nicht nur bei der Entstehung und der Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Entwicklung der sogenannten Chemotherapieresistenz.

Bei diesen Resistenzen gegen Zytostatika kann prinzipiell zwischen zwei Gruppen unterschieden werden, nämlich der bereits primär bestehenden Chemotherapieresistenz und der während der Behandlung erworbenen Chemotherapieresistenz.

So werden beispielsweise beim nativen Mammakarzinom stark überexprimierte ABC-Transporter-Proteine (aus dem Englischen: ATP binding cassette) nachgewiesen, die durch die Signalproteine Snail 1 und Twist gesteuert werden (Du & Shim, 2016).

Auch der Sonic Hedgehog Signalweg ist dabei von Bedeutung (Sari *et al.*, 2018).

Mit Hilfe dieser ABC-Proteine können Tumorzellen Zytostatika aus dem Zellinneren entfernen und so eine Resistenz gegen Chemotherapeutika entwickeln.

2.2 Der Sonic Hedgehog Signalweg, PTCH 1 und Smoothed in der EMT

In den nachfolgenden Kapiteln werden die onkologische Bedeutung und die Interaktion einzelner Signalwege der EMT beschrieben, die bei der Entstehung und Progression von NET der Lunge von Bedeutung sein könnten.

Der Hedgehog Signalweg ist ein wesentliches Element bei der embryonalen Zelldifferenzierung. Bisher wurden drei verschiedene Hedgehog Proteine beim Menschen bzw. bei Säugetieren nachgewiesen. Es handelt sich dabei um die Polypeptid-Liganden Desert, Indian und Sonic. Der bisher am besten untersuchte Proteinligand ist Sonic. Es handelt sich hierbei um ein 45 kDa-Protein, das im Cytosol in ein N-terminales und ein C-terminales Peptid aufgespalten wird. Nach dem bisherigen Kenntnisstand hat nur das N-terminale Peptid nach seiner Zellausschleusung eine Funktion.

Während der Embryonalzeit steuert der Sonic Hedgehog (SHH) Signalweg die Morphogenese und sein Fehlen kann zu schweren Missbildungen des Neuralrohres führen.

Beim gesunden Erwachsenen ist das SHH Protein hingegen kaum nachweisbar (Skoda *et al.*, 2018). Es spielt aber, wenn es aktiviert wird, eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese.

Die Aktivierung des SHH Signals außerhalb der Embryonalentwicklung induziert das Entstehen diverser Malignome. Seine maligne Potenz konnte z. B. bei der Tumorentstehung der Lunge, der Mamma, des Magens, des Pankreas, der Ovarien, des Kolons, der Haut und des hämatologischen Systems nachgewiesen werden (Amakye *et al.*, 2013; Im & Joo, 2013; Sheng *et al.*, 2004).

Die Bedeutung des SHH beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) konnte Jiang nachweisen, indem er zeigte, dass in Tumoren von NSCLC Patienten höhere Level des SHH vorliegen als im gesunden Lungengewebe (Jiang *et al.*, 2015). Auch beim Magenkarzinom konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und der SHH Expression klinisch nachgewiesen werden (Yoo *et al.*, 2011).

Nach seiner Synthese in den Zellen, wird SHH aufgespalten und in den extrazellulären Raum sezerniert, in dem es dann an seinen Rezeptor PTCH 1 bindet und ihn deaktiviert. Bei PTCH 1 handelt es sich um ein 12-helikales Transmembranprotein, das die Aufgabe hat das Protein Smoothed (SMO) zu hemmen. Bei den Lungenkarzinomen wird das Ausmaß der Bedeutung von SHH bisher noch kontrovers diskutiert. Es existieren Studien, die eine erhöhte Aktivität von SHH in Lungenkarzinomen nachgewiesen haben. Diese Erhöhung korrelierte aber nicht sicher mit den klinischen Verläufen (Raz *et al.*, 2012). Hwang konnte im Gegensatz dazu zeigen, dass bei fortgeschrittenen Lungenkarzinomen eine positive Korrelation zwischen der Prognose und der SHH Aktivität vorlag (Hwang *et al.*, 2014).

Durch experimentelle Arbeiten mit Lungenkarzinomen konnte Jiang ferner belegen, dass durch die Inhibition des SHH Signalwegs die Tumorzellmigration und die Tumorerinvasion gehemmt werden (Jiang *et al.*, 2015). Außerdem konnte in vitro gezeigt werden, dass die Hemmung von SHH zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika führt.

Solange das Hedgehog Protein inaktiv ist, sorgt das transmembrane PTCH 1 Rezeptor-Protein auf der Zelloberfläche in physiologischer Weise dafür, dass das Signalprotein SMO daran gehindert wird, Signale in die Zelle zu senden. Bei SMO handelt es sich um ein zelluläres Membranprotein, das ein essenzieller Bestandteil des SHH Signalweges ist. Nach der Inaktivierung des auf der Zelloberfläche lokalisierten PTCH 1 Komplexes durch

SHH wird SMO in die Zellen eingeschleust und dort, durch bisher nicht vollständig aufgeklärte Vorgänge, aktiviert (Sari *et al.*, 2018). In der Zelle kann SMO, dann zum einen als Onkogen wirken, zum anderen sorgt es dafür, dass der Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci) nicht mehr abgebaut werden kann.

Wenn aber das Hedgehog Protein aktiv an PTCH 1 bindet und es damit deaktiviert, wird zusätzlich die Einschleusung von anderen Proteinen in die Zelle gefördert, die dort mit dem Protein Ci einen großen Komplex bilden, der dann nicht mehr abgebaut werden kann. Danach kann dieser Proteinkomplex zusammen mit dem Ci Protein in den Zellkern diffundieren und dort die Genexpression von Gliom-assoziierten Onkogenen (GLI1) aktivieren, die bei der Tumorneogenese von Bedeutung sind (Gonnissen *et al.*, 2015). Diese Vorgänge werden in Abb. 9 schematisch nach Büller dargestellt (Büller *et al.*, 2012). Besonders bei der Entstehung von Basalzellkarzinomen ist dieser Signalweg bisher gut untersucht (Von Hoff *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit geht es darum, an den histologischen Präparaten von Patienten mit NET der Lunge das Ausmaß der Expression des Liganden Sonic Hedgehog zu untersuchen.

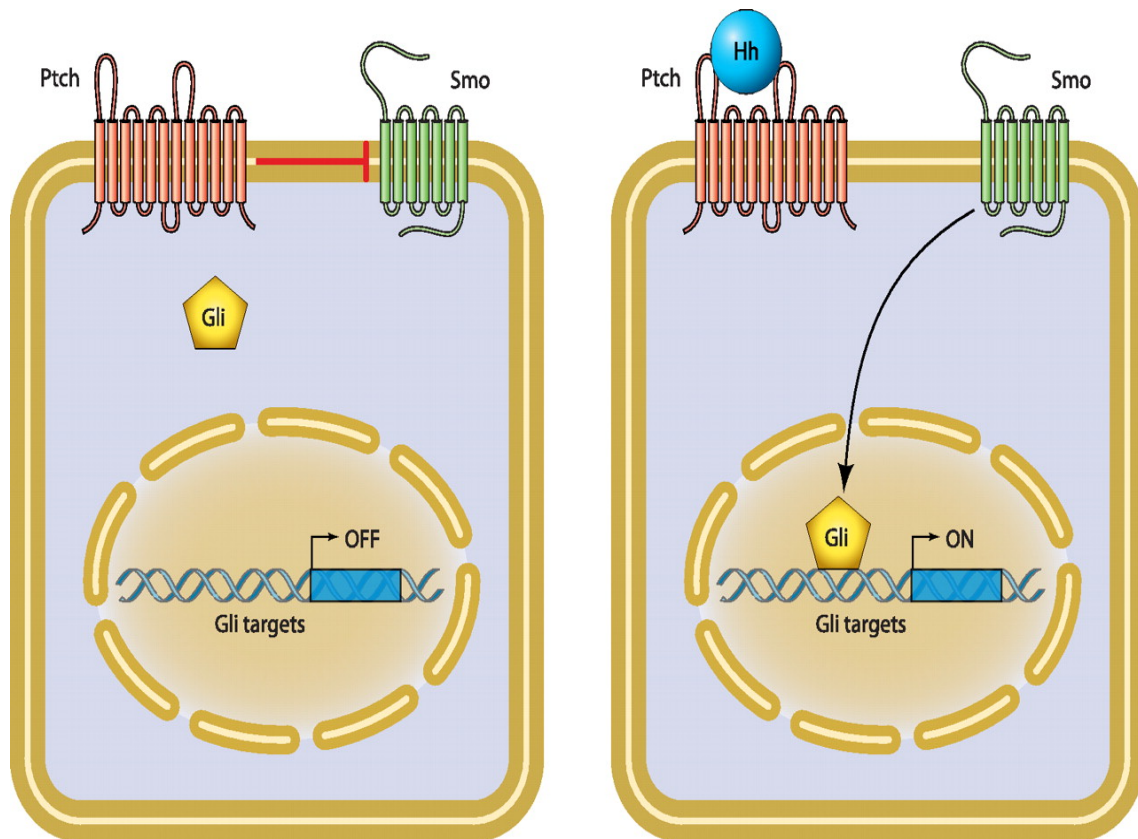


Abbildung 9: Schematische Darstellung des SHH Signalweges nach Nikè V. J. A. Büller, Sanne L. Rosekrans, Jessica Westerlund, Gijs R. van den Brink *Physiology* Published 11 June 2012 Vol. 27 no. 3, 148-155.

2.3 Die Bedeutung von Snail 1 in der EMT

Beim gesunden erwachsenen Menschen kommt dem Transkriptionsfaktor Snail 1 durch die EMT 2 unter anderem eine Bedeutung bei der Wundheilung zu.

Entscheidender ist aber seine Rolle bei der EMT 3, die dann zur Bildung von entarteten Zellen führt.

Bei Snail 1 handelt es sich um ein Protein, das an spezielle Strukturen der DNA-Sequenzen binden kann und bei der Metastasierung von herausragender Bedeutung ist (Kroepil *et al.*, 2012; Pěa *et al.*, 2009).

Snail 1 steuert im Tumorgewebe über diverse Signalwege die Unterdrückung der Expression von E-Cadherin und unterstützt so die Tumورprogression, indem durch den

Mangel von E-Cadherin die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen reduziert und ihre Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung erhöht wird (Fendrich *et al.*, 2009).

Ferner konnte Nakamura nachweisen, dass die Snail 1-mRNA durch den Transforming-Growth-Factor beta (TGF- β) hochreguliert wird, wodurch es zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen kommt (Nakamura *et al.*, 2018).

In Abb. 10 wird in einem vereinfachten Diagramm die Stellung von Snail 1 bei der EMT in Anlehnung an Wang dargestellt (Wang *et al.*, 2013).

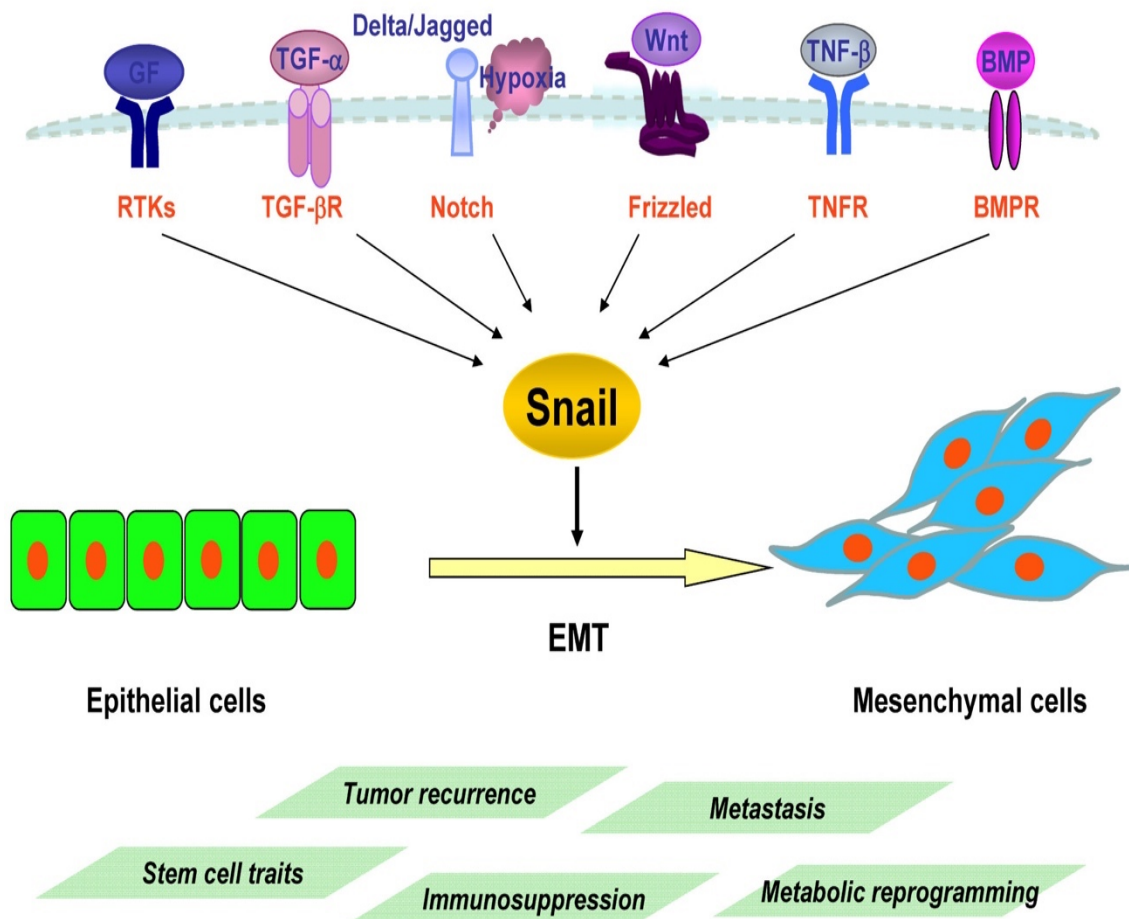


Abbildung 10: Schematic diagram of the signaling pathways associated with Snail-induced EMT. An integrated and complex signaling network, including RTKs, TGF- β , Notch, Wnt, TNF- α , and BMPs signaling pathways, activate the transcription factor Snail, resulting in the induction of EMT. The expression of Snail causes a metabolic reprogramming, confers tumor cells with stem cell-like traits, resistance to immunosuppression, and promotes tumor recurrence and metastasis (Wang *et al.*, 2013).

In einer Arbeit von Galván konnte gezeigt werden, dass Snail 1 bei entdifferenzierten NET der Lunge zu einer starken Herabregulierung von E-Cadherin führt, was dann signifikante Auswirkungen auf die Verschlechterung der 5-Jahres Überlebensraten dieser Patienten hatte (Galván *et al.*, 2014).

Snail 1 und Slug (auch Snail 2 genannt) spielen vermutlich auch bei der Entstehung der Resistenz gegen Chemotherapeutika eine wichtige Rolle (Nakamura *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2013).

Eine verstärkte Expression von Snail 1 wurde bisher in verschiedenen Tumoren, vor allem aber bei Pankreaskarzinomen und Mammakarzinomen nachgewiesen (Hotz *et al.*, 2007; Moody *et al.*, 2005).

2.4 Die Bedeutung von E-Cadherin in der EMT

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehören. Sie sind von entscheidender Bedeutung bei der Zell-zu-Zell-Adhäsion und spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebedifferenzierung. Es gibt unterschiedliche Cadherin-Moleküle, die jeweils eine andere Gewebsverteilung aufweisen. Das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) ist in Embryonen und beim erwachsenen Menschen in den meisten Epithelien vorhanden.

In einschichtigen Epithelien wie im Darmtrakt sammelt sich E-Cadherin vor allem an der basolateralen Membran. Das Fehlen von E-Cadherin führt - wie auch das Fehlen von Snail 1 - bereits beim Embryo zum Zelltod. Durch das Fehlen dieser Signalmoleküle wird die Gastrulation verhindert, was zum Tod des Embryos führt (Dengler, 2018). Um die Entwicklungen im Embryo korrekt ablaufen zu lassen, müssen Cadherine und ihre Expression streng kontrolliert werden. Da eine Fehlexpression die Aktivierung von Tumorgenen begünstigt und somit die Entstehung von Metastasen fördert, ist eine Kontrolle auch im erwachsenen Organismus unerlässlich (Onder *et al.*, 2008).

Eine Herabregulierung der E-Cadherin-Expression ist häufig bei der Tumorentwicklung an der Schwelle vom gutartigen Adenom zum malignen Karzinom nachweisbar. Diese Verringerung der Aktivität von E-Cadherin durch das Abschalten des E-Cadherin-Gens

scheint bei der EMT ein entscheidender Faktor für die Metastasenbildung zu sein (Stemmler *et al.*, 2003).

Der Verlust des epithelialen Cadherins (E-Cadherin) auf der Zelloberfläche führt dann zum Verlust der Zell-zu-Zell-Adhäsionen und fördert so die Tumorprogression (Gupta & Massagué, 2006). Dieser Verlust von E-Cadherin wurde im Rahmen der Metastasenbildung in zahlreichen Tumoren nachgewiesen. Der Einfluss von Snail 1 auf die Hemmung von E-Cadherin bei der Tumorgenese und Metastasierung wurde bereits klinisch ausführlich demonstriert, siehe Kapitel 2.3 (Kroepil *et al.*, 2012; Pěa *et al.*, 2009). So konnte klinisch beim NSCLC die Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin (Kaifi *et al.*, 2015) und einer häufigeren Metastasierung sowie einer schlechteren Überlebensrate belegt werden (Kase *et al.*, 2000).

Der gegenteilige Effekt findet sich jedoch beim neuralen Cadherin (N-Cadherin), bei dem die verstärkte Expression mit einem stärkeren invasiven Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose korreliert (Hotz *et al.*, 2007).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das E-Cadherin bei der EMT herunterreguliert wird, während das N-Cadherin eine Hochregulation erfährt. Die niedrigere Expression von E-Cadherin führt dann zu signifikant schlechteren Überlebensraten. Aber auch der Anstieg von N-Cadherin korreliert mit schlechteren Überlebensraten. Dieses Zusammenspiel zwischen dem Herunterregulieren von E-Cadherin und dem Hochregulieren von N-Cadherin wird als Cadherin-Switch beschrieben (Berx & van Roy, 2009). Wegen der besonderen Bedeutung von E-Cadherin bei der Tumorgenese ist es für den hier untersuchten Kontext interessant, wie es sich mit der Anwesenheit von E-Cadherin bei den NET der Lunge verhält.

2.5 Die Bedeutung von Vimentin in der EMT

Vimentin (Vim) ist ein Baustein des Zellskelettes menschlicher Zellen und hat ein Molekulargewicht von ca. 57 kDa (Kilodalton). Es ist ein Typ 3-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine und findet sich im Zytoplasma der Zellen, die einen mesenchymalen Ursprung haben (z. B. Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen). Es spielt, wie auch die zuvor genannten Expressionsmarker, eine signifikante Rolle bei der

EMT (Liu *et al.*, 2015). Die Intermediärfilamente dienen sowohl der mechanischen Zellstabilität als auch der Signalübertragung zwischen den Zellen. Eine Überexpression von Vimentin führt zu einer verstärkten Zellbeweglichkeit, die dann bei entarteten Zellen auch zu einer höheren Invasion und Metastasierungsrate führt. Zahlreiche wissenschaftliche Studien zeigen, dass Vimentin auch eine bedeutende Rolle bei der Progression von Lungenkarzinomen spielt, was sich sowohl auf die Tumorgenese und die Zellinvasion als auch auf die Befähigung zur Metastasierung bezieht (Havel *et al.*, 2015). Besonders die Zellwanderung wird durch Vimentin als wichtigem Marker beeinflusst, wodurch sich seine herausgehobene Rolle in der Kaskade der Metastasierung erklärt. Auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber der Apoptose wird durch Vimentin gefördert. Besonders bei dukталen Mammakarzinomen ist Vimentin im Tumorgewebe stark exprimiert (Liu *et al.*, 2015). In der Histopathologie wird es inzwischen für den Nachweis von Weichteiltumoren herangezogen. Da einige Karzinome ihre histologische Identität mit ihrem Ursprungsgewebe verlieren können, kann die Immunhistochemie (IHC) eine Zuordnung zu einem Grundgewebe erleichtern (Pernick, 2020). Vimentin wird fast immer in Sarkomen gebildet und kann deshalb auch als Marker bei Weichgewebstumoren eingesetzt werden. Inwiefern es bei den NET der Lunge überexprimiert wird, war ein Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

2.6 Die Bedeutung von Twist in der EMT

Als Twist wird ein Transkriptionsfaktor bezeichnet, der eine wichtige Rolle bei der Metastasierung maligner Tumoren spielt. Es handelt sich bei Twist um ein Protein, das von einem sog. Master-Gen gesteuert wird. Master-Gene steuern andere Gene im Rahmen verschiedener zellulärer Prozesse. Während der Embryonalzeit ist Twist nur über einen kurzen Zeitraum des embryonalen Stadiums (Gastrulation) aktiv. Im späteren Entwicklungsstadium des Embryos und nach der Geburt ist Twist bei gesunden Menschen komplett inaktiv (Hotz *et al.*, 2007).

Twist kann aber durch diverse Signalwege aktiviert werden, so z. B. durch Akt, die mitogen aktivierende Proteinkinase, RAS (Protoonkogen) und Wnt-Signale.

Wenn Twist über eines dieser Signale aktiviert worden ist, führt es zu einem Herunterregulieren von E-Cadherin und einem Hochregulieren von N-Cadherin, die - wie vorher beschrieben wurde - eine zentrale Rolle bei der EMT und der Metastasenbildung spielen (Yang *et al.*, 2004). Twist fördert, wie auch die anderen in dieser Arbeit untersuchten Marker, die EMT der Lungen-Epithelzellen. Eine Hemmung der Twist Expression konnte die Überlebensrate von Patienten mit einem NSCLC signifikant verbessern (Lee *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2004; Wushou *et al.*, 2014).

In einer klinischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Expression von Twist signifikant mit dem Tumorstadium beim Plattenepithelkarzinom korrelierte (Seyedmajidi *et al.*, 2018).

Die Höhe der Twist Expression korreliert ferner nach einer Metaanalyse von Zeng auch mit einer schlechten Prognose beim Lungenkarzinom (Zeng *et al.*, 2015). Der Transkriptionsfaktor Twist und auch Snail 1 werden in vielen verschiedenen Tumortypen überexprimiert. Twist entfaltet dabei seine tumorinduzierende Wirkung vorwiegend über den Weg der Herabregulierung von E-Cadherin (Sánchez-Tilló *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2006 Yang *et al.*, 2004). Twist schützt die Tumorzellen außerdem vor der Apoptose und trägt damit wesentlich zur Tumorresistenz gegen Chemotherapeutika bei. Die Inaktivierung von Twist gilt derzeit als eine von vielen neuen Therapieansätzen in der Onkologie (Khan *et al.*, 2013). Ob sich dieser therapeutische Ansatz auch bei den NET der Lunge sinnvoll verfolgen lässt, sollte durch die Bestimmung der Twist Expression in diesen Tumoren geklärt werden.

3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Untersuchung der Rolle der Signalwege SHH, PTCH 1, Twist, E-Cadherin, Vimentin, SMO und Snail 1 bei der EMT. Es soll deren mögliche Eignung entweder als diagnostischer Marker, oder als Ziel einer medikamentösen Behandlung von NET der Lunge ermittelt werden.

Rimkus konnte nämlich in einer Phase I Studie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom nachweisen, dass die Hemmung des SHH Signalwegs mittels SMO-Inhibitoren ein therapeutischer Ansatz sein kann (Rimkus *et al.*, 2016). Auf dieser Grundlage sollte geklärt werden, welche Aktivitäten die o. g. Signalwege der EMT bei den NET der Lunge haben.

Da ferner die Differenzierung zwischen den TC und den AC der NET der Lunge nach wie vor ein klinisches bzw. diagnostisches Problem darstellt, sollte geklärt werden, inwiefern die IHC und die PCR bei der Abgrenzung der beiden Tumorarten voneinander hilfreich sein können.

Außerdem wurde das Wachstumsverhalten einer humanen bronchialen Karzinoid-Zelllinie unter dem Einfluss verschiedener Hemmstoffe der EMT Signalwege in vitro untersucht, um festzustellen, ob sich daraus medikamentöse oder therapeutische Ansätze ableiten lassen.

4 Patienten und Methoden

Nach dem positiven Bescheid der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Marburg (AZ 68/14) wurden die Untersuchungen durchgeführt, die dieser Dissertation zu Grunde liegen. Darin wurde genehmigt, die EMT Signalwege bei Patienten mit NET der Lunge bezüglich ihres Expressionsverhaltens zu untersuchen.

Es wurden auf der Grundlage dieses Bescheides die Tumorsignalwege an den histologischen Proben von 20 Patienten mit einem NET der Lunge untersucht. Ferner wurde anhand dieses Tumormaterials mit Hilfe der PCR überprüft, ob diese Methode der IHC beim Nachweis der Tumorsignalwege im Rahmen der EMT überlegen ist.

Des Weiteren wurde versucht, mit sog. Signalwegs-Inhibitoren das Wachstumsverhalten der Bronchialkarzinoid-Zelllinie CRL-5815 zu beeinflussen.

4.1 Patienten mit neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeproben von 20 Patienten verwendet, die zwischen 1996 und 2014 an einem histologisch gesicherten NET der Lunge operiert worden waren. Die Histologien wurden sowohl am Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie in Wetzlar (ÜGP-MVZ) als auch am Universitätsklinikum Marburg (UKGM) untersucht und beurteilt. Nachfolgend werden die Patienten mit ihrem Tumorstadium, dem Mitose-Index und nach der Einstufung in TC bzw. AC tabellarisch aufgelistet.

Fortl. Pat.-Nr.	Histo.-Nr.	Erkrankungsalter	Geschlecht	TNM-Klassifikation, Grading	Metastasen bei OP	Tumorart
1	1	67	M	pT1, pN0 (0/15), MX, G1, R0	Nein	TC
2	3	79	W	pT1a, pN0 (0/29), M0, G1, R0	Nein	TC
3	7	57	M	pT1a, pN0 (0/8), G1, R0	Nein	TC
4	9	38	W	pT1a, pN0 (0/34), G1, R0	Nein	TC
5	12	57	W	TX, pN0 (0/4), G1, R0	Nein	TC
6	13	63	W	pT1b, pN0 (0/8), G1, R0	Nein	TC
7	15	57	M	pT1, pN0 (0/32), G1, R0	Nein	TC
8	17	49	W	pT1a, pN1 mi (1/23), M0, G1, R0	LK	TC
9	21	68	M	TX, N0 (0/49), R0	Nein	TC
10	4	31	M	pT1a, pN0 (0/12), G1, R0	Nein	AC
11	5	40	W	pT1b, pN0 (0/39), G1, R0	Nein	AC
12	6	64	M	pT1b, pN0 (0/18), MX, G1, R0	Nein	AC
13	10	40	W	pT1, pN3, G2, R0	LK	AC
14	11	57	M	pT3, pN0 (0/28), G3, R0	Nein	AC
15	14	66	M	pT1a, pN0 (0/10), G1, R0	Nein	AC
16	16	72	W	pT1, pN2, pM1a (Pleura), R1	Intra-thorakale LK-Metastase, Pleura-karzinose	AC
17	18	68	W	pT4, NX, MX, G1	Nein	AC
18	22	56	W	pT1a pN0 (0/22), G2, R0	Nein	AC
19	-	32	W	T1, NX, R0	Nein	AC
20	-	60	W	pT4(m), pN1 (6/18), R1	LK	AC

Tabelle 4: Patientenliste mit dem jeweiligem Tumorstadium, unterteilt in TC und AC.

Da es sich um ältere Paraffinschnitte gehandelt hat, waren alle Präparate zunächst in Formalin fixiert worden. Dabei waren 9 Patienten einem typischen Karzinoid und 11 Patienten einem atypischen Karzinoid zugeordnet worden.

Die histologischen Färbungen umfassten die herkömmliche HE-Färbung und immunhistologische Färbungen mit Chromogranin und Synaptophysin.

4.2 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um ein spezielles laborchemisches Verfahren, das zur Darstellung und Identifizierung von gewebe- und zelltypischen Antigenen (AG) mit der Hilfe von spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern (AK) dient. Die IHC kommt vor allem im Bereich der Tumordiagnostik zur Anwendung. Sie dient nicht nur der Identifizierung, sondern auch der Klassifizierung von Tumoren, deren Zellen eine große morphologische Ähnlichkeit aufweisen, sich jedoch in ihrem Metastasierungs- und Wachstumsverhalten unterscheiden. Sie kann somit auch hinsichtlich der Prognose wichtig sein und Hinweise zur Anwendung unterschiedlicher Therapieverfahren liefern.

Das Prinzip dieses immunhistologischen Färbeverfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der verwendete AK bindet je nach Affinität an bestimmte AG der Gewebe, die sogenannten Epitope. Je spezifischer ein AK ist, umso genauer kann er ein spezifisches Epitop detektieren und dann daran binden. Der AK ist mit einem Detektionssystem verbunden, das dazu dient, über eine Farbreaktion die Epitope sichtbar zu machen. Es gibt verschiedene Detektionssysteme. Das gebräuchlichste ist die Avidin-Biotin-Komplex-Technik (ABC), die auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Ferner kann die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP) und die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Technik (PAP) zur Anwendung kommen.

Einige AG werden durch verschiedene chemische Stoffe wie z. B. Formalin in ihrer Funktion und Eigenschaft so verändert, dass eine Vorbehandlung der Präparate notwendig ist. Durch proteolytische Enzyme oder durch eine Mikrowellenbehandlung können diese AG demaskiert werden, sodass sie dann von den AK durch Bindung detektiert werden können.

Die Analyse und Beurteilung immunhistologischer Färbungen erfordern erfahrene und geschulte Pathologen, da das Ergebnis der einzelnen Färbungen alleine in vielen Fällen keinen eindeutigen Rückschluss auf die Entität des Tumors gibt. Die Ergebnisse der Färbungen müssen zusammen mit allen anderen Befunden und den klinischen Angaben zu den einzelnen Patienten betrachtet werden.

Die Untersuchung der hier erhobenen Daten der IHC erfolgte in enger Zusammenarbeit mit den Pathologen des Instituts für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie in

Wetzlar (ÜGP-MVZ) und des Universitätsklinikums Marburg (UKGM), wofür den Verantwortlichen an dieser Stelle nochmals ausdrücklich gedankt wird.

4.2.1 Färbeprotokolle

Die IHC-Färbungen mit den jeweiligen Antikörpern gegen die verschiedenen Signalproteine wurden an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten aus der Pathologie des Universitätsklinikums Marburg (UKGM) vorgenommen. Die Präparate stammten aus dem Zeitraum von Februar 1996 bis Januar 2014.

Die folgenden Antikörper wurden bei der IHC-Färbung verwendet:

1. *Anti-Vimentin antibody [RV202] ab8978 von der Firma Abcam*
2. *Anti-E Cadherin antibody ab15148 von der Firma Abcam*
3. *Anti-Patched / PTCH1 antibody ab53715 von der Firma Abcam*
4. *Anti-Sonic Hedgehog antibody [EP1190Y] ab53281 von der Firma Abcam*
5. *Anti-Twist antibody [Twist2C1a] - ChIP Grade ab50887 von der Firma Abcam*
6. *Smoothed Antibody NBP2-24543 von der Firma Novusbio*
7. *Snail (C15D3) Rabbit mAb #3879 von der Firma Cell Signaling*

Am ersten Arbeitstag wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten in einem Xylol Bad entparaffinisiert. Danach erfolgte eine zweimalige zehnminütige Rehydration mit zunächst 80%igem und anschließend 99,9%igem Ethanol.

Anschließend wurde eine Spülung mit dH₂O für zweimal fünf Minuten vorgenommen. Die Antigendemaskierung wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in einem pH 6,0 Citratpuffer bei 700 Watt für zehn Minuten durchgeführt. Danach wurden die Proben 20 Minuten mit Eis gekühlt und dann dreimal fünf Minuten mit dH₂O gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde danach für zehn Minuten 3%iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aufgetragen, das im Anschluss durch eine zweimal fünfminütige Spülung mit dH₂O entfernt wurde. Nach einer fünfminütigen Spülung mit PBST erfolgte die Umsetzung in eine feuchte Kammer. Anschließend wurden die

Schnitte für 60 Minuten in einer Blockierungslösung (10 % BSA in PBST) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurde der jeweilige primäre AK mit einer speziell für den jeweiligen AK getesteten Verdünnungslösung (Snail 1:1:100; SHH: 1:200; PTCH1 1:100; SMO: 1:100; Twist; 1:50; Vimentin: 1:500; E-Cadherin: 1:100) aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert.

Am zweiten Arbeitstag wurde der primäre Antikörper abgegossen, die Schnitte wurden für dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und danach für 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper gefärbt (1:250 in PBST plus BSA 10 % verdünnt).

Nach 30 Minuten wurde eine ABC Lösung durch einen Fertig-KIT hergestellt. Diese Lösung musste dann für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken im Dunkeln aufbewahrt werden.

Der sekundäre Antikörper wurde dann mittels einer dreimaligen, fünfminütigen Waschung mit PBST entfernt. Es erfolgte danach eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, nachdem zuvor jeweils 12 µg der Testlösung A und B verdünnt in 1000 µl PBST aufgetragen wurden. Anschließend erfolgte die Waschung mit PBST für fünf Minuten. Auf jedes zu färbende Slide wurden 200 µl einer DAB-Lösung aufgetragen und unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion nach der Braunfärbung mit dH₂O gestoppt.

Das Gegenfärben erfolgte in saurem Häkalaun (nach Mayer) für 30 Sekunden. Diesem Vorgang schloss sich eine fünfminütige „Bläuung“ in lauwarmem Leitungswasser an. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (95 % und 99,9 %) wurde die Dehydrierung für jeweils zweimal zehn Minuten vorgenommen. Es erfolgte dann eine Spülung in Xylol für zweimal zehn Minuten. Zum Abschluss wurden die Objekte dann mit Roti®-Histol fixiert.

4.2.2 Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

Da die Beurteilung der Färbungen in der Immunhistochemie zumindest teilweise der subjektiven Beurteilung des jeweiligen Pathologen unterliegt, wurde die IHC-

Begutachtung von zwei erfahrenen Pathologen unabhängig voneinander nach den Kriterien von Remmele und Stegner, und der von ihnen entwickelten semiquantitativen Methode durchgeführt (Remmele & Stegner, 1986). Remmele und Stegner haben schon 1986 bei der Bestimmung von Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom einen sog. immunreaktiven Score (IRS) entwickelt, mit dem sich die Färbereaktionen der IHC besser objektivieren lassen. Die diesem Score zu Grunde liegenden Kriterien, nach denen die Berechnungen erfolgten, werden in der Tabelle 5 in Anlehnung an die Arbeit der beiden Autoren zur Übersicht dargestellt. Mit dieser Methodik lassen sich nach den Aussagen der beiden Autoren die Ergebnisse verschiedener Pathologen relativ gut vergleichbar machen.

Darüber hinaus wurden bei der Beurteilung der IHC-Präparate immer die folgenden Kriterien beurteilt: Färbeintensität, gefärbte Strukturen und das zelluläre Verteilungsmuster. Ferner wurde zwischen der zytoplasmatischen, der nukleären und der membranösen Färbung unterschieden.

Färbeintensität	Anteil der positiven Tumorzellen	Maximaler Score (Punkte: % pos. Tumorzellen X Punkte: Färbeintensität)	Minimaler Score
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	3 * 4 = 12	0 * 0 = 0
1 = schwache Färbereaktion	1 = < 10 % positive Zellen		
2 = mäßige Färbereaktion	2 = 10-50 % positive Zellen		
3 = starke Färbereaktion	3 = 51–80 % positive Zellen		
	4 = > 80 % positive Zellen		

Tabelle 5: Immunreaktiver Score (IRS) in Anlehnung an Remmele und Stegner (1986).

Zum besseren Verständnis, wird ein Berechnungsbeispiel gegeben: Eine starke Färbereaktion in über 80 % der Tumorzellen ergibt einen IRS Score von $3 * 4 = 12$. Ein Score von 12 weist somit auf eine maximale Aktivität des untersuchten Signalweges hin. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse, die durch die IHC-Färbung gegenüber den einzelnen Antigenen der EMT Signalwege erzielt wurden, werden nachfolgend exemplarische Histologien abgebildet. Die jeweils verwendeten AK wurden bereits unter 4.2.1 beschrieben.

Zur statistischen Überprüfung, ob durch die Berechnung des immunreaktiven Scores, Unterschiede bei der Signalwegexpression zwischen den TC und den AC vorliegen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet (Mann & Whitney, 1947).

4.2.2.1 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Sonic Hedgehog Expression

Die Abb. 12 und 13 zeigen ein NET nach der immunhistochemischen Anfärbung mit dem IgG-Antikörper Sonic Hedgehog, im Vergleich zu einem gesunden Lungengewebe (Abb. 11). Wie zu erwarten, war im gesunden Lungengewebe nur eine unspezifische Anfärbung des Alveolar-Epithels sichtbar, da der SSH beim gesunden Lungengewebe nicht aktiv ist.

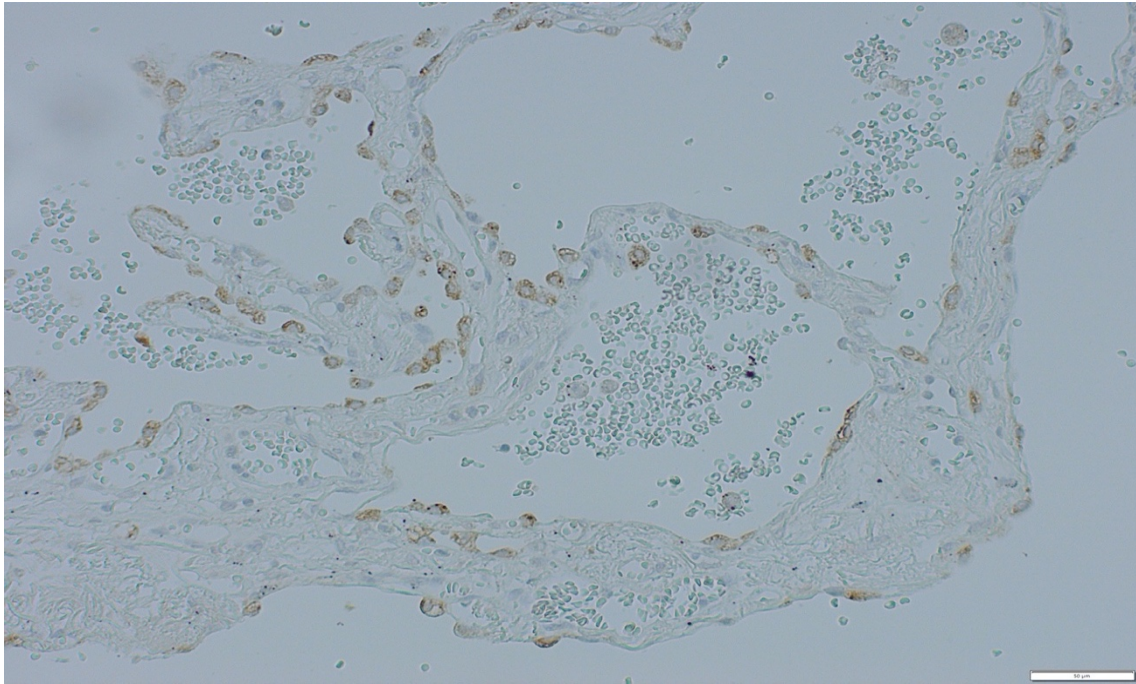


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung einer negativen Kontrollfärbung gegen Sonic Hedgehog (SHH) bei einem gesunden Lungengewebe (es liegt eine unspezifische Anfärbung des Alveolar-Epithels vor) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Die Intensität der zytoplasmatischen und membranösen Färbereaktion beim TC und AC wird anhand der histologischen Schnitte in den Abb. 12 und 13 sichtbar. Die Färbereaktion korrelierte dabei positiv mit dem Malignitätsgrad des Tumorgewebes.

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, führte die Anfärbung mit dem SHH Antikörper zu einer deutlichen Anfärbung der Membranen und des Zytoplasmas. Diese Färbereaktion war bei dem in Abb. 13 gezeigten AC noch stärker ausgeprägt als bei dem weniger malignen TC in Abb. 12.

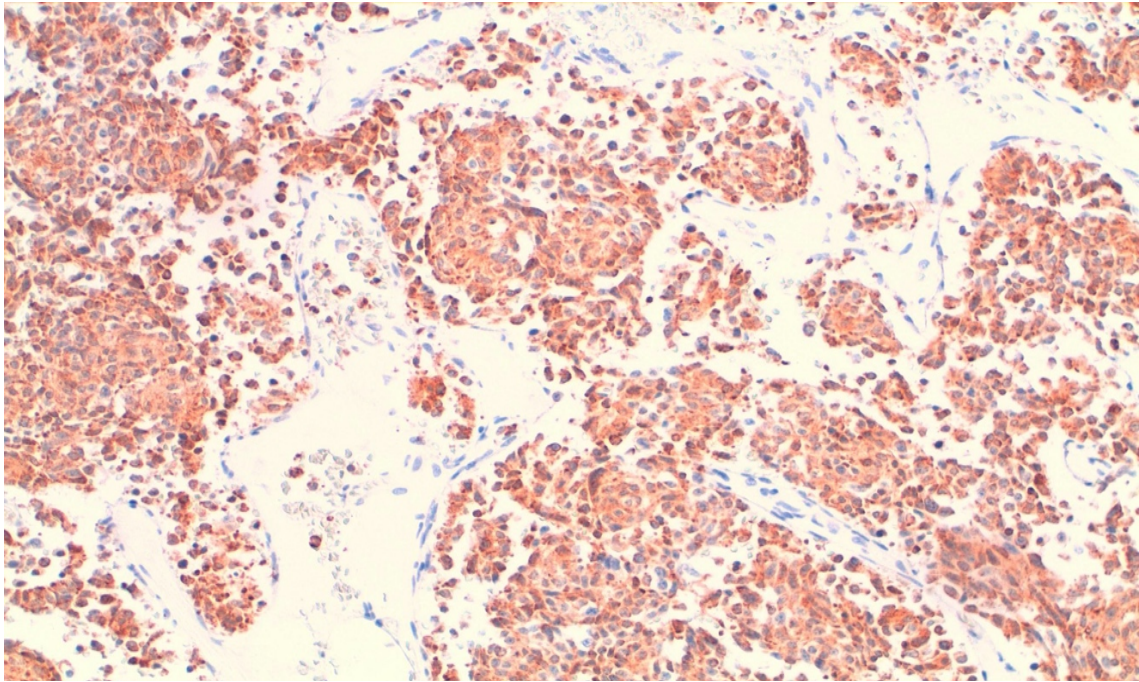


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Anfärbung von SHH sowohl im Zytoplasma als auch an den Membranen bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

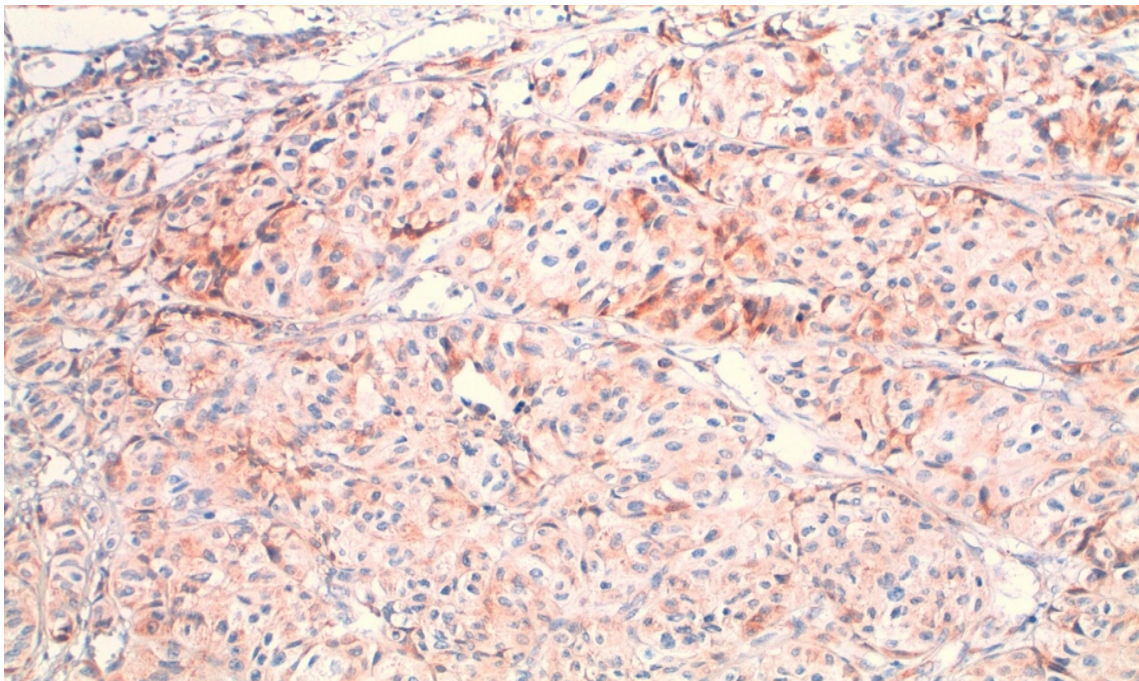


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der noch stärkeren Anfärbung von SHH bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.2.2.2 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von PTCH 1

Nachfolgend werden exemplarisch, immunhistochemisch mit dem IgG-Antikörper PTCH 1, gefärbte Schnitte dargestellt (Abb. 15 und 16). Dabei wurde wie zuvor ein gesundes Lungengewebe als Referenzfärbung herangezogen, das in Abb. 14 zu sehen ist.

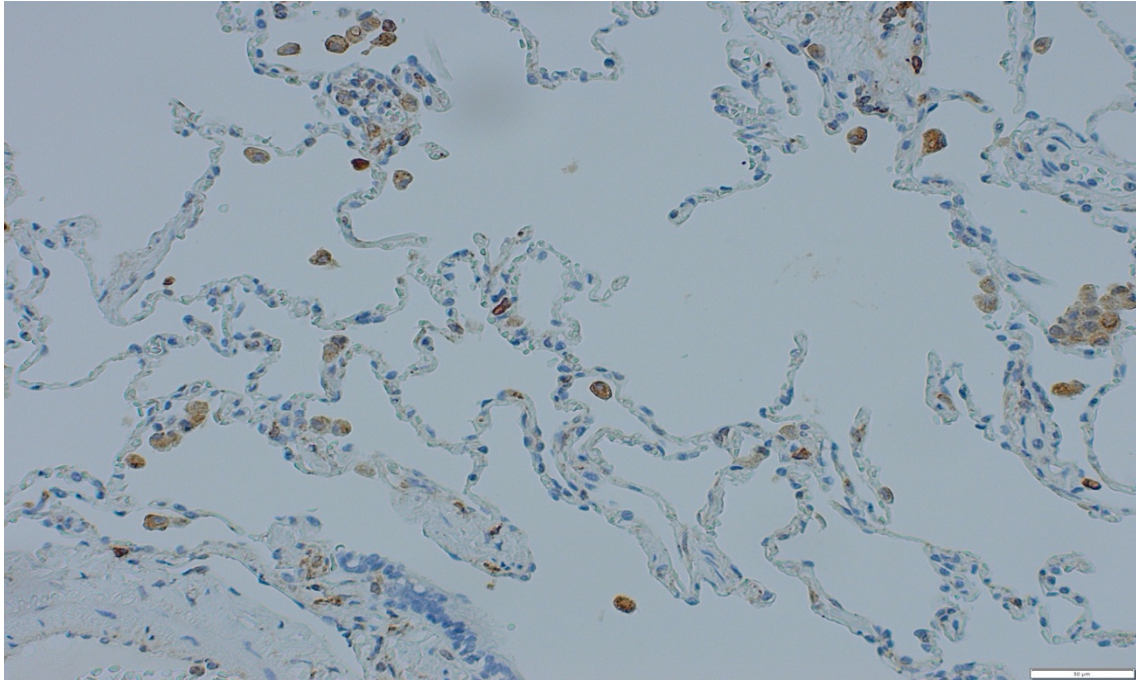


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung einer positiven IHC-Färbung gegen PTCH 1 bei einem gesunden Lungengewebe in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Die kräftige nukleäre Anfärbung von PTCH 1 bei einem typischen Lungenkarzinoid ist in Abb. 15 zu sehen, während Abb. 16 die Anfärbung bei einem atypischen Lungenkarzinoid zeigt, wobei zwischen den beiden Präparaten kein wesentlicher Unterschied in der Anfärbung vorliegt.

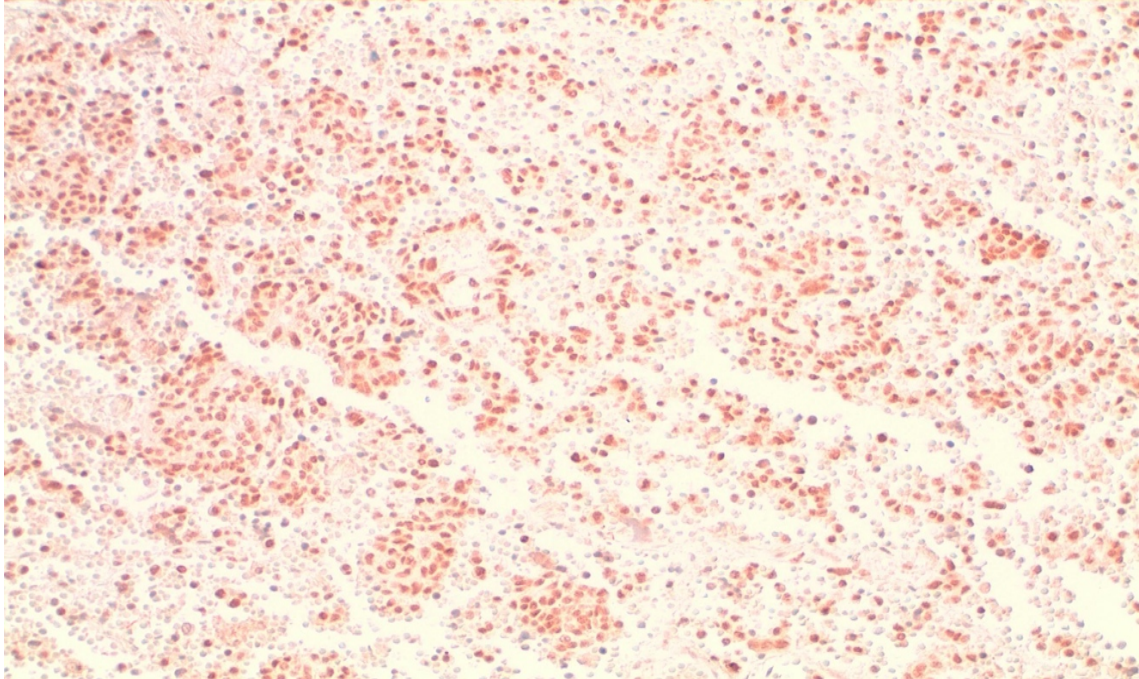


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Anfärbung von PTCH 1 bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

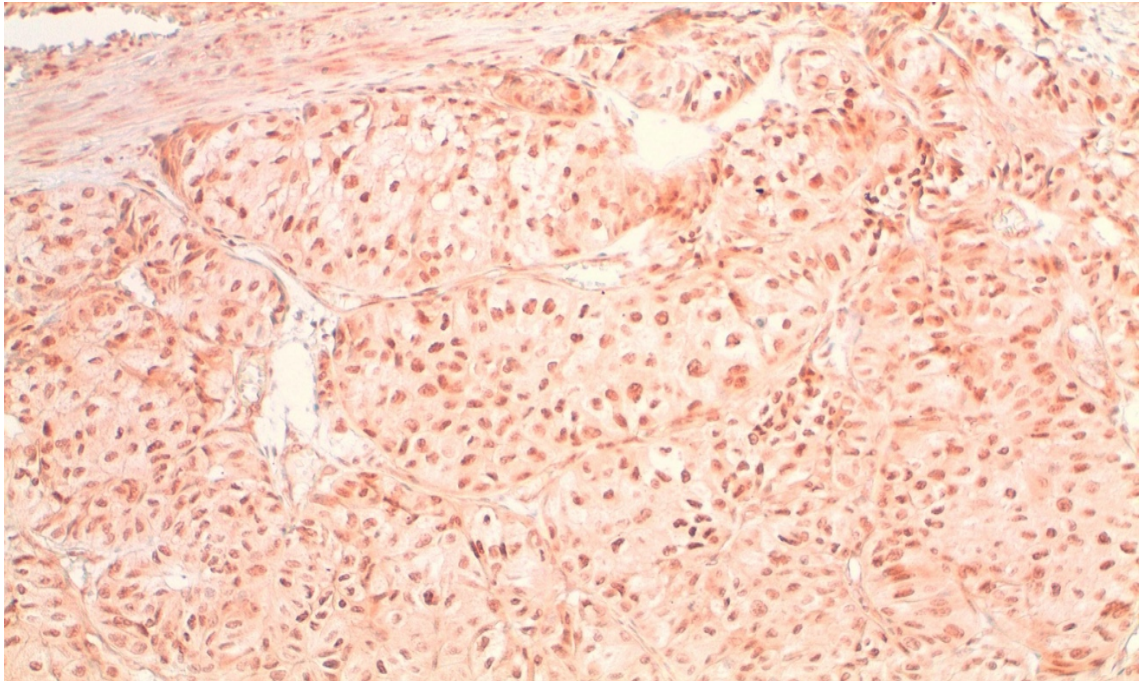


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung einer Anfärbung von PTCH 1 bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.2.2.3 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von SMO

Bei der Kontrollfärbung des normalen Lungengewebes mit dem Smoothened-Antikörper (SMO-AK) kam es wie in Abb. 17 zu sehen ist, nur zu einer unspezifischen Anfärbung der Alveolar-Makrophagen.

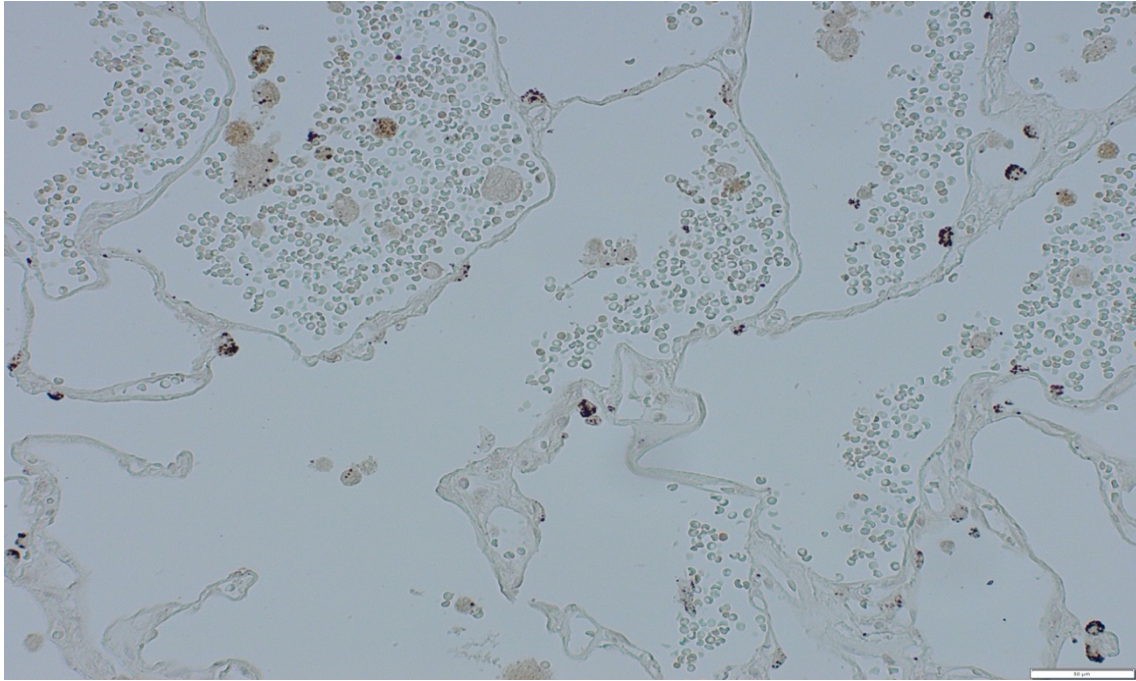


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung einer negativen Kontrollfärbung gegen SMO bei einem gesunden Lungengewebe mit nur unspezifischer Anfärbung der Alveolar-Makrophagen in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Nach Anfärbung der Tumorschnitte mit einem SMO-AK trat beim TC in sämtlichen Tumorzellen eine deutliche zytoplasmatische Färbereaktion als Nachweis des SMO in der Zelle auf (Abb. 18).

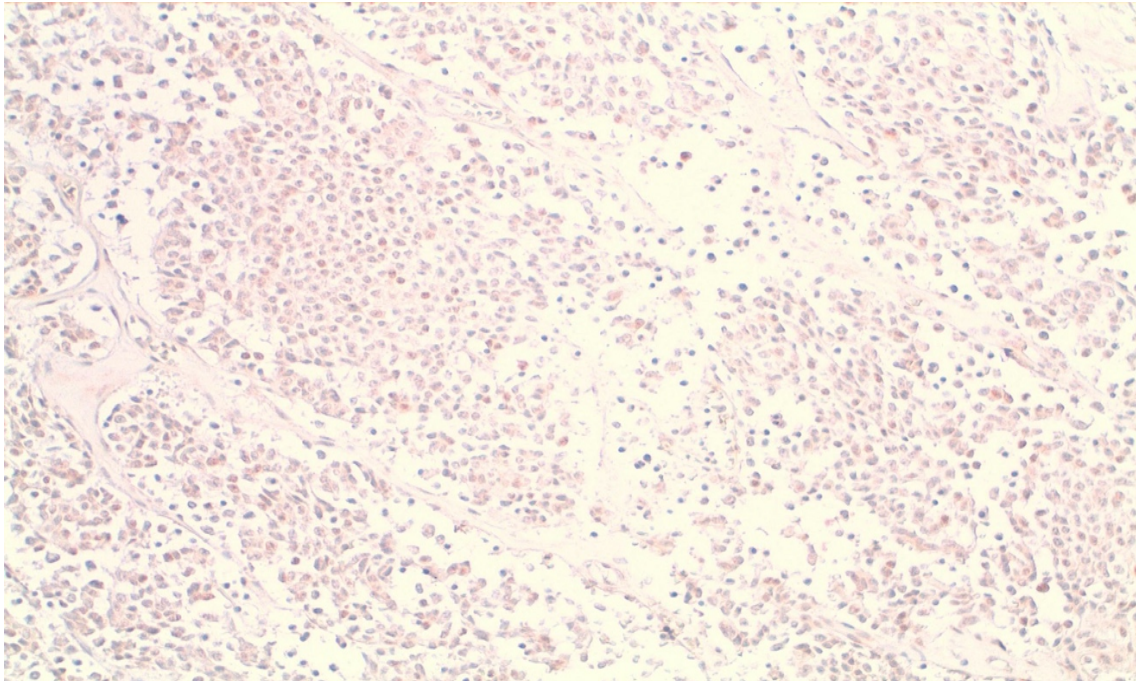


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung einer positiven immunhistochemischen SMO-Anfärbung bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) in 200-facher Vergrößerung. Die Färbereaktion des Zytoplasmas ist im Vergleich zur Färbung beim AC aber schwächer ausgeprägt. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

In Abb. 19 ist die sehr starke zytoplasmatische Anfärbung gegenüber dem SMO-AK bei einem atypischen Lungenkarzinoid zu sehen.

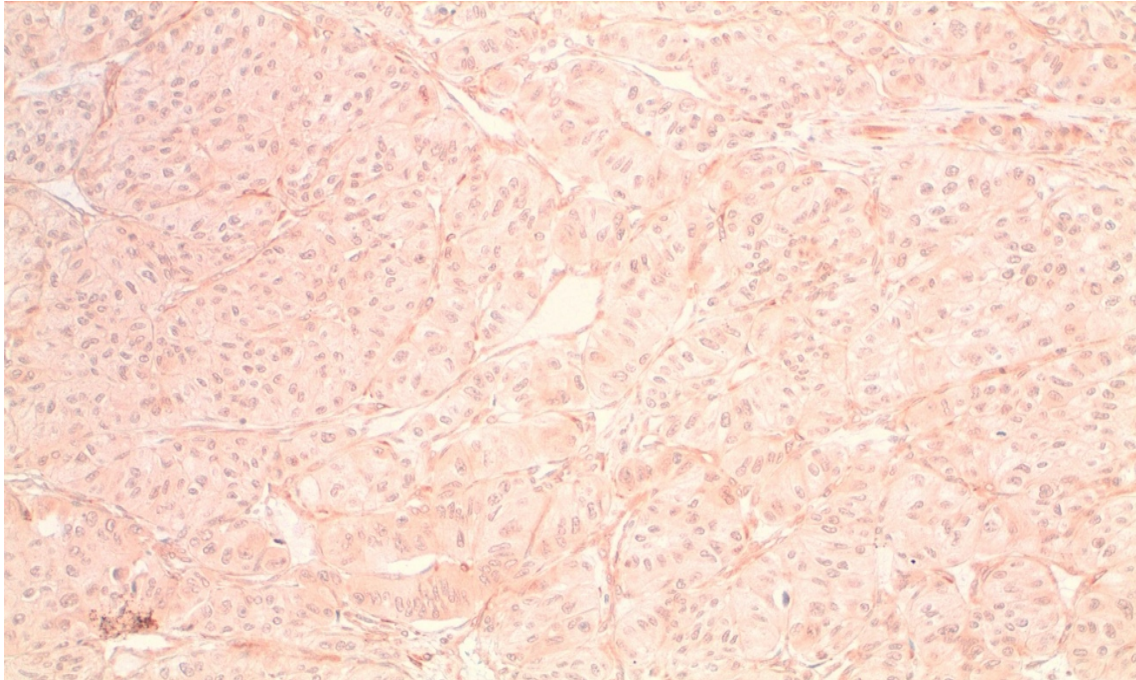


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung einer deutlich starken zytoplasmatischen IHC-Anfärbung von SMO bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.2.2.4 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Snail 1

Nachfolgend werden exemplarisch, immunhistochemisch mit dem IgG-Antikörper Snail 1, gefärbte Präparate abgebildet.

Wie auf der unten folgenden Abb. 20 zu sehen ist, war beim gesunden Lungengewebe nur eine geringe unspezifische Färbung der Alveolar-Epithelien vorhanden.

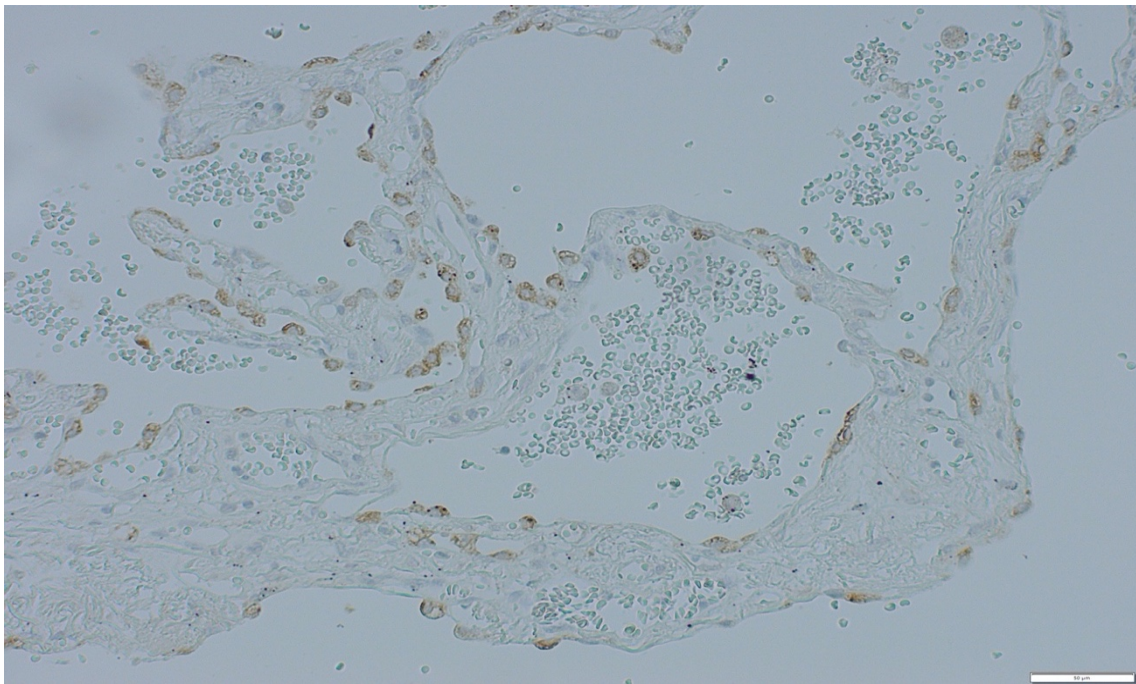


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung einer negativen Kontrollfärbung gegen Snail 1 bei einem gesunden Lungengewebe (gering unspezifische Färbung der Alveolar-Epithelien) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Bei der Snail 1 Färbung des typischen Lungenkarzinoides (TC) war im Gegensatz dazu eine deutliche membranöse Färbereaktion, sowie eine mäßige zytoplasmatische Anfärbung erkennbar (Abb. 21).

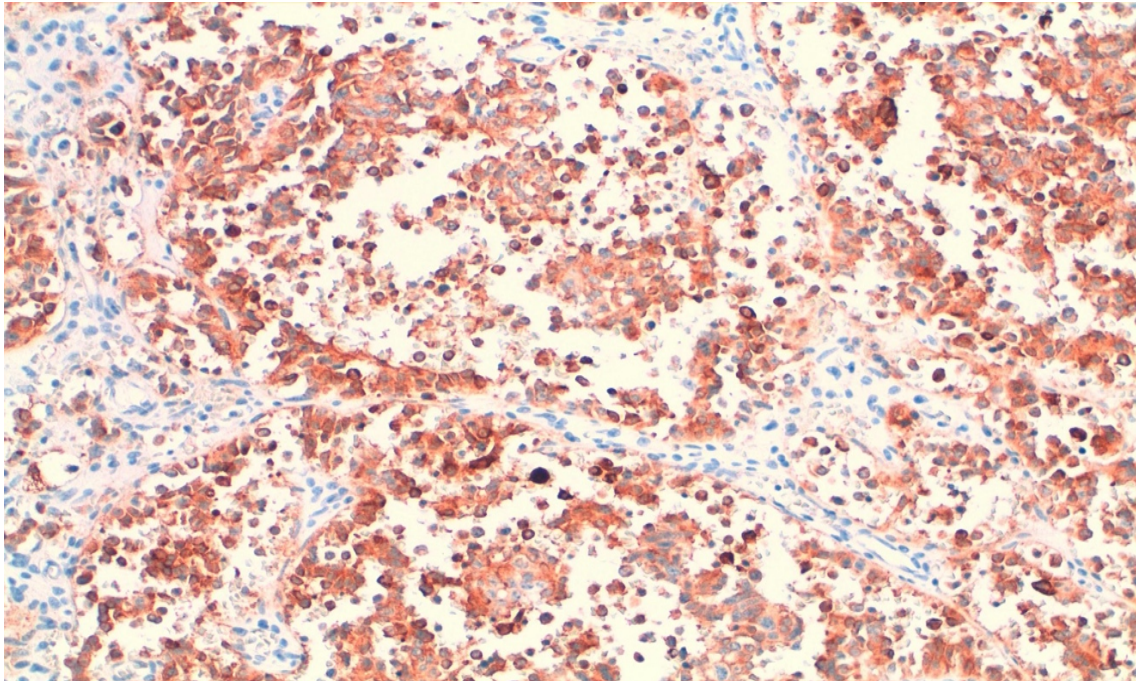


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung einer positiven immunhistochemischen Anfärbung von Snail 1 bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) mit einer signifikanten membranösen Anfärbung in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Die IHC-Färbung des AC gegenüber Snail 1 führte sowohl zu einer starken Anfärbung des Zytoplasmas als auch der Zellmembranen. Die Färbereaktionen waren deutlich ausgeprägter als beim TC (Abb. 22).

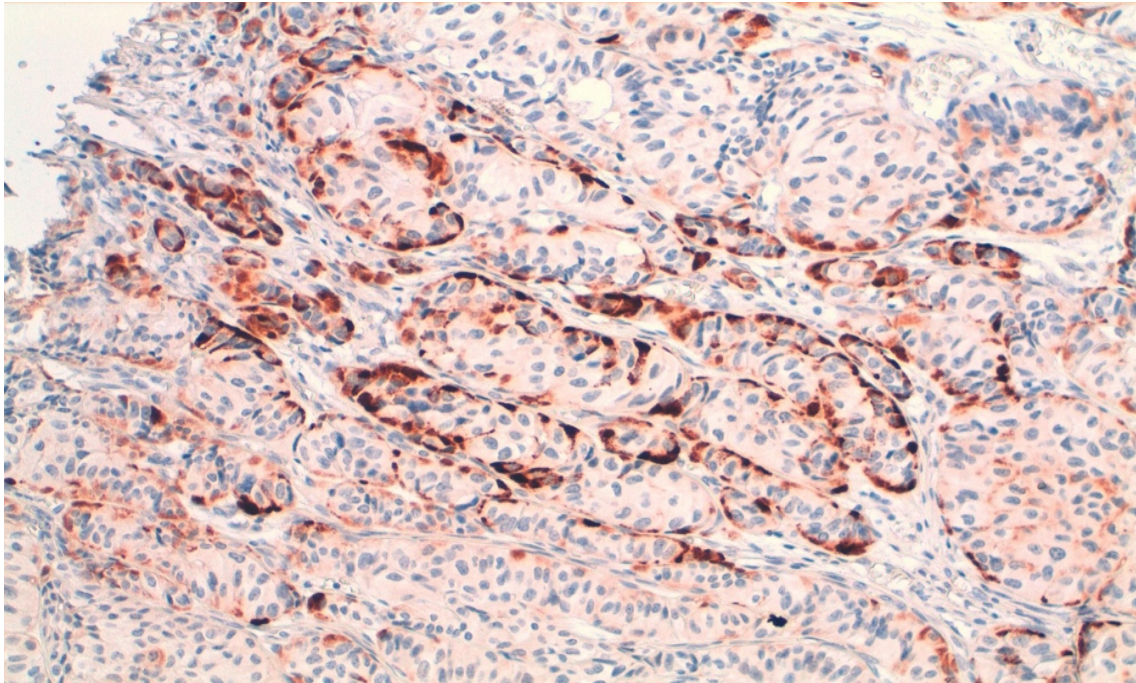


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Anfärbung von Snail 1 bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. Die Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellmembran ist bei diesem AC im Vergleich zu der beim TC wesentlich ausgeprägter sichtbar. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.2.2.5 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von E-Cadherin

Nachfolgend werden exemplarisch, immunhistochemisch mit dem IgG-Antikörper E-Cadherin, gefärbte Schnitte dargestellt.

Wie zuvor wurden auch hier sowohl gesundes Lungengewebe als auch ein TC und ein AC verwendet. Die Abb. 23 lässt erkennen, dass die Membranen der Alveolaren positiv auf E-Cadherin reagiert haben.

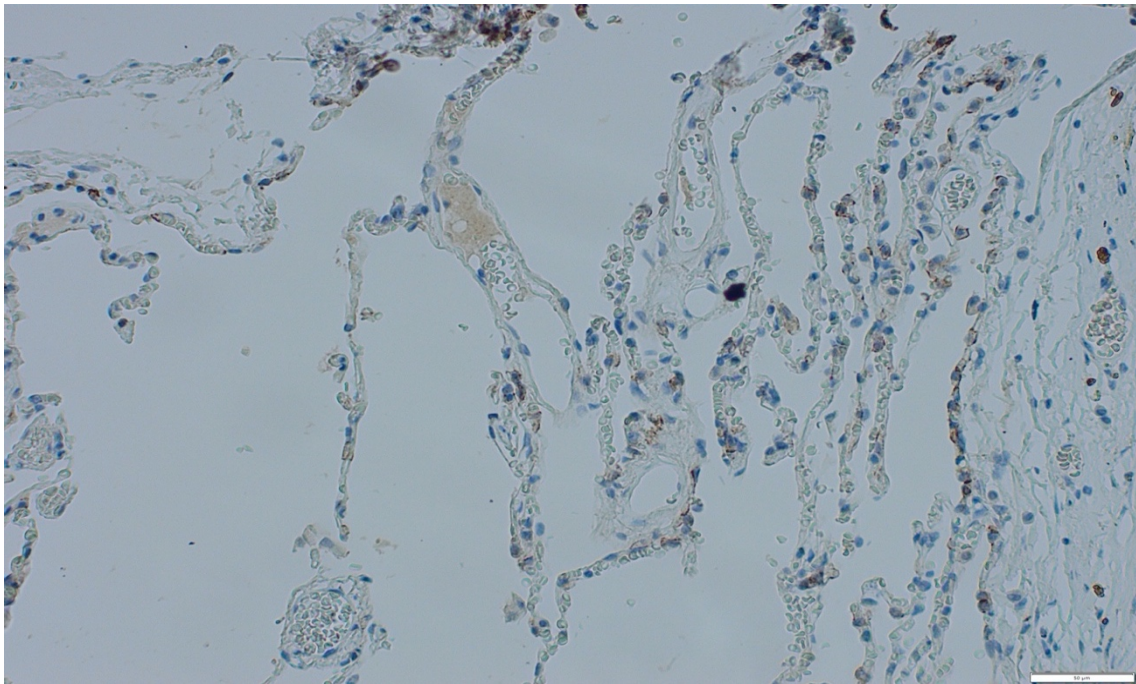


Abbildung 23: Exemplarische Darstellung einer positiven Kontrollfärbung an den Membranen bei einem gesunden Lungengewebe in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

In der Abb. 24 sieht man deutlich, dass der IgG-Antikörper gegen E-Cadherin stark mit den Zellmembranen reagiert hat.

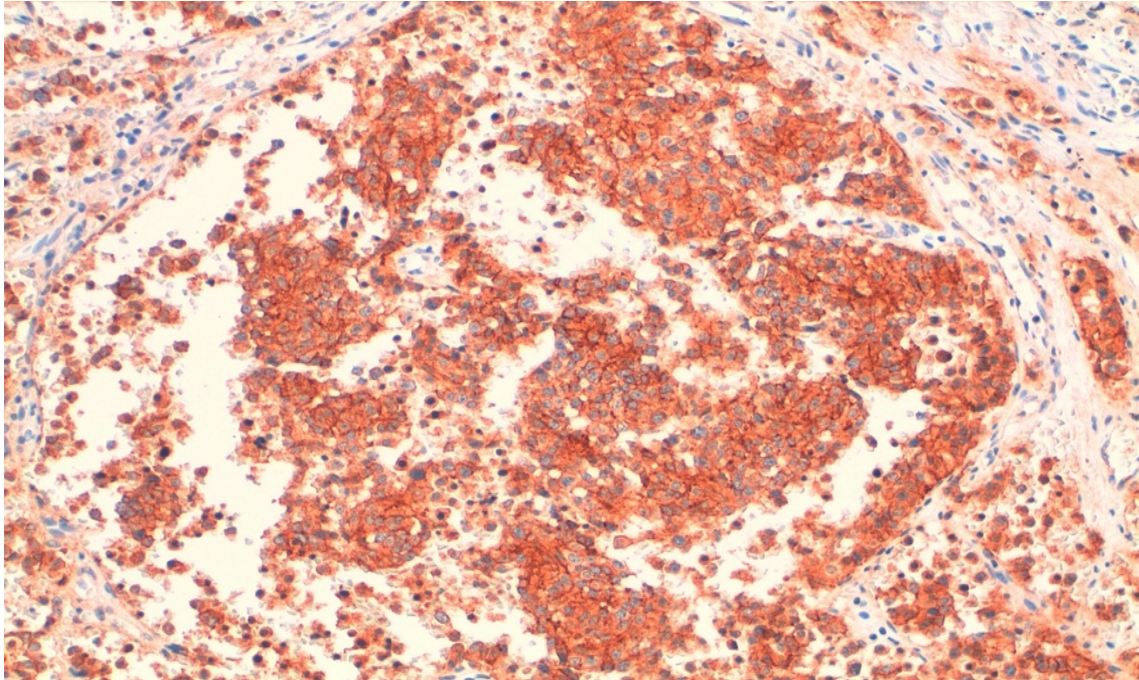


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung einer starken immunhistochemischen Anfärbung der membranären Strukturen mit einem IgG-Antikörper von E-Cadherin bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

In der Abb. 25 kommt dieser Färbeeffekt an den Zellmembranen bei einem AC ebenso zur Darstellung.

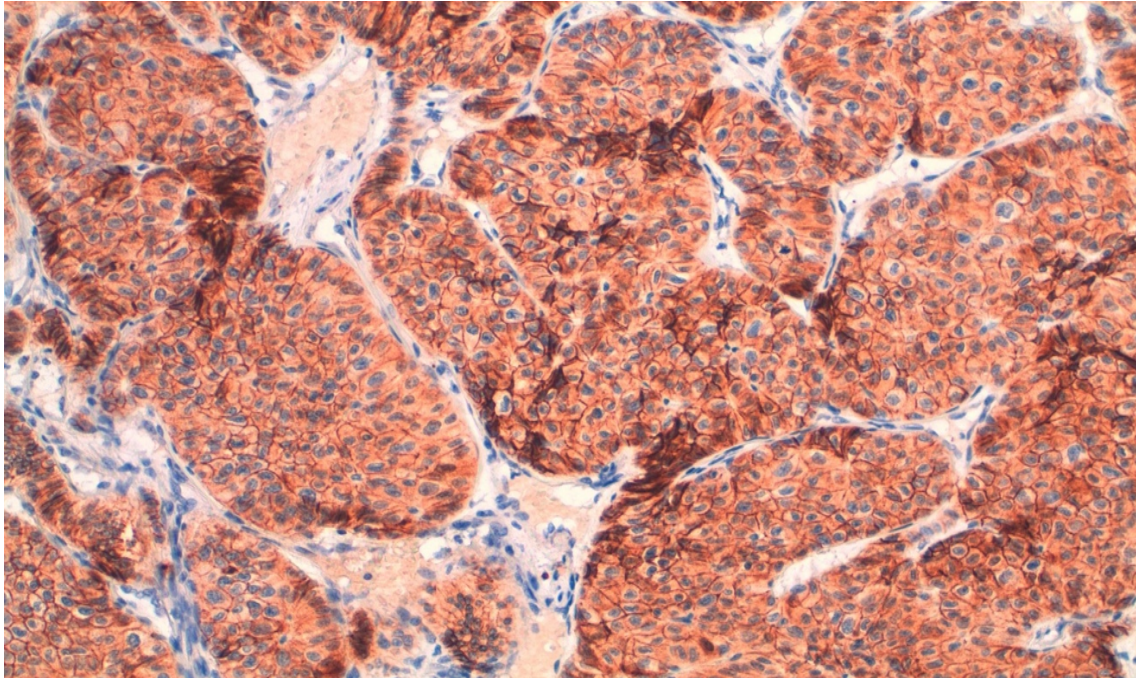


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung einer positiven immunhistochemischen Membran-Anfärbung von E-Cadherin bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Alle drei Färbungen sind somit sichtbar positiv an den Membranen gefärbt und zeigen keine Unterschiede in der E-Cadherin Expression beim TC und AC, sowie bei normalem Lungengewebe.

4.2.2.6 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Twist

Nachfolgend werden exemplarisch, immunhistochemisch mit dem IgG-Antikörper gegen Twist, gefärbte Schnitte dargestellt.

In Abb. 26 ist die IHC-Färbung gegen Twist am normalen Lungengewebe zu sehen. Eine Anfärbung der Alveolaren ist nicht sichtbar.

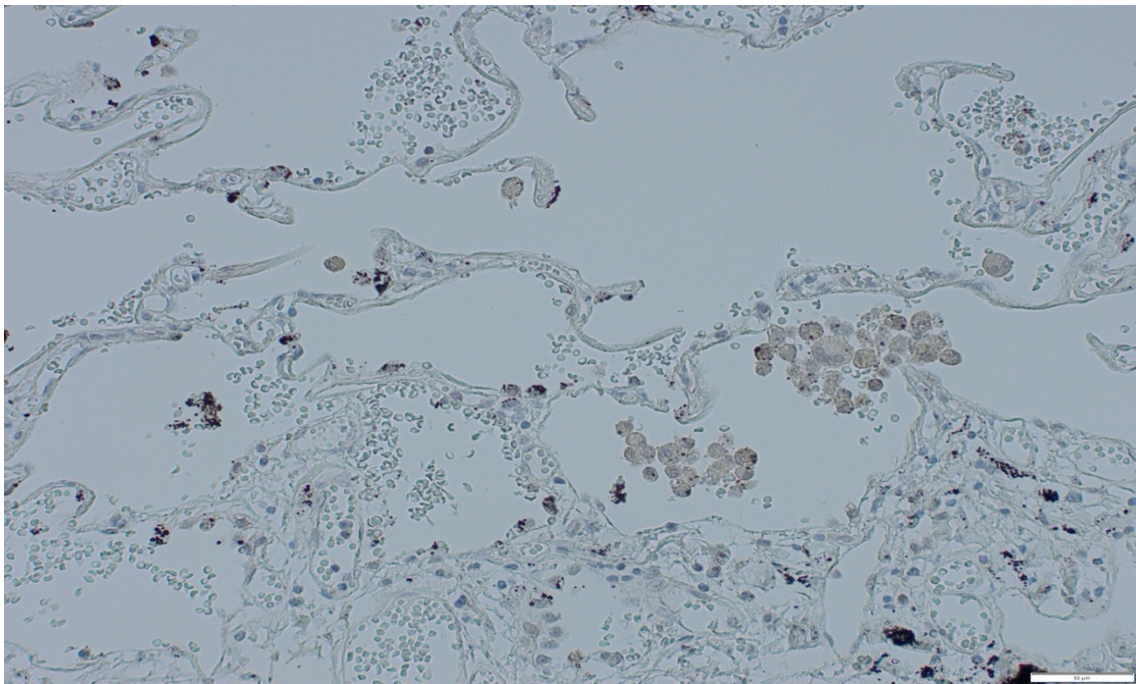


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung einer negativen Kontrollfärbung der Alveolaren gegen Twist bei einem gesunden Lungengewebe in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Bei der Anfärbung des TC in Abb. 27 ist ebenso keine Färbereaktion am Tumorgewebe erkennbar.

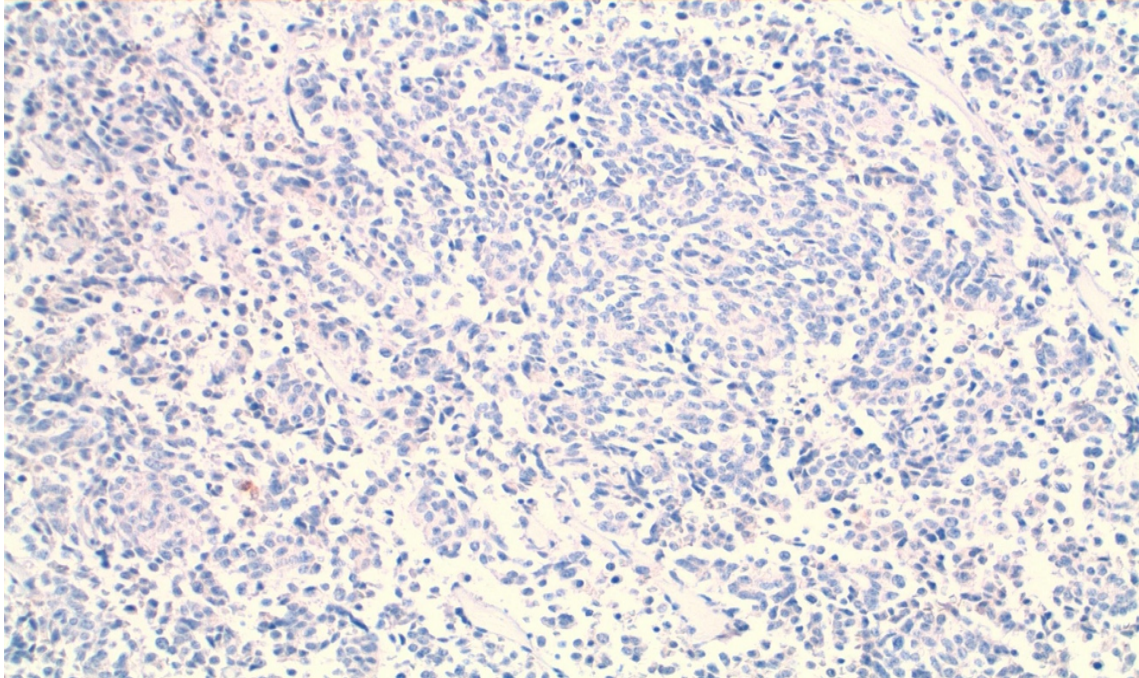


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Nicht-Anfärbung von Twist bei einem typischen Lungenkarzinoid (TC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Bei der Färbung des AC gegen Twist ist nur eine geringe, unspezifische und diffuse Färbereaktion des Zytoplasmas vorhanden, die aber nach der Aussage der Pathologen nicht einem Twist Nachweis entspricht.

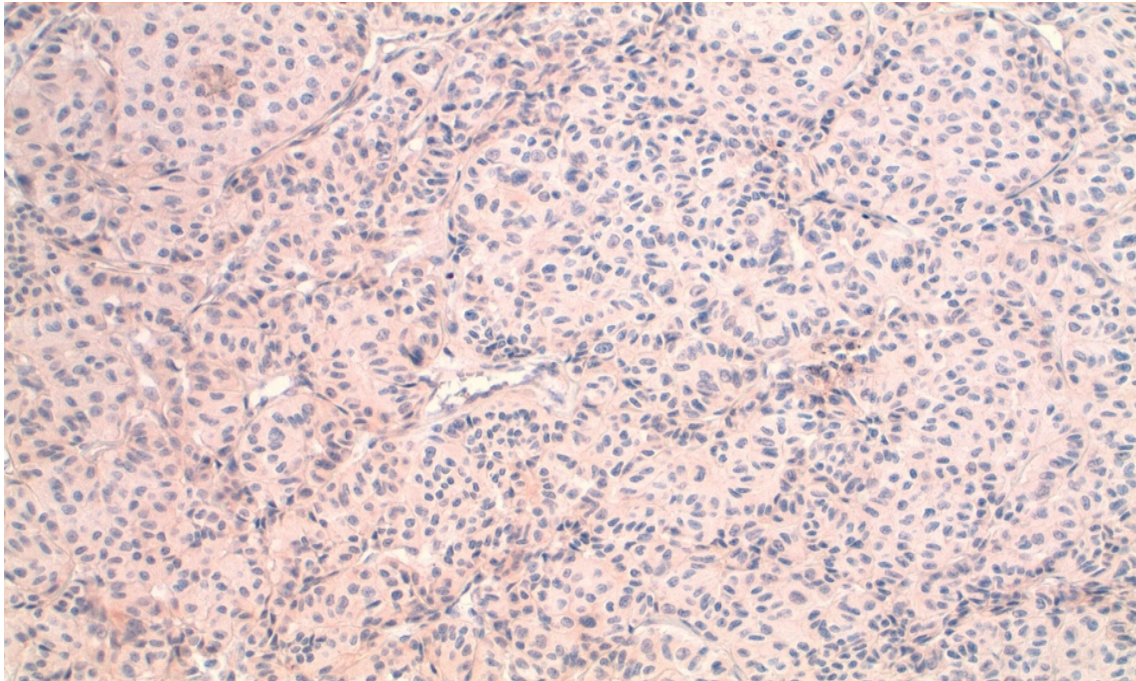


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Nicht-Anfärbung von Twist bei einem atypischen Lungenkarzinoid (AC) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.2.2.7 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Expression von Vimentin

Nachfolgend werden exemplarisch, immunhistochemisch mit dem IgG-Antikörper Vimentin, angefärbte Schnitte dargestellt. Abb. 29 zeigt die negative Färbereaktion auf Vimentin in tumorfreiem Lungengewebe mit positiver Anfärbung der Alveolar-Makrophagen.

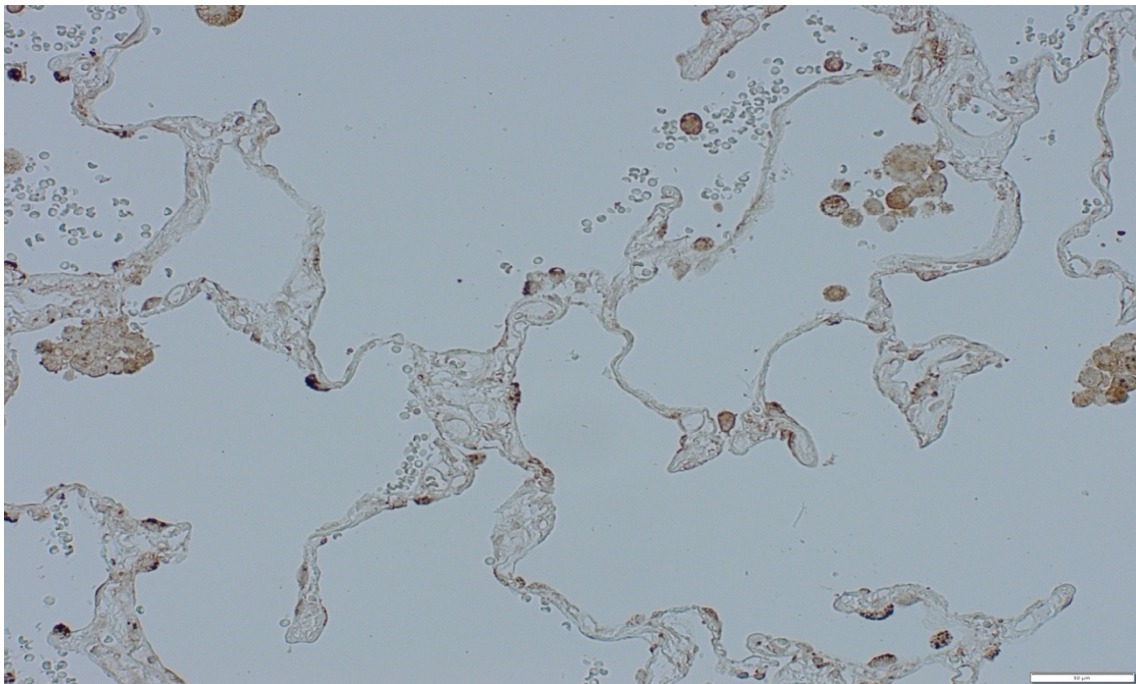


Abbildung 29: Exemplarische Darstellung einer negativen Kontrollfärbung von Vimentin bei einem gesunden Lungengewebe in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

Die Abb. 30 und 31 zeigen das Tumorgewebe ohne Färbereaktion auf Vimentin, bei lediglich positiver Anfärbung der intratumoralen Blutgefäße.

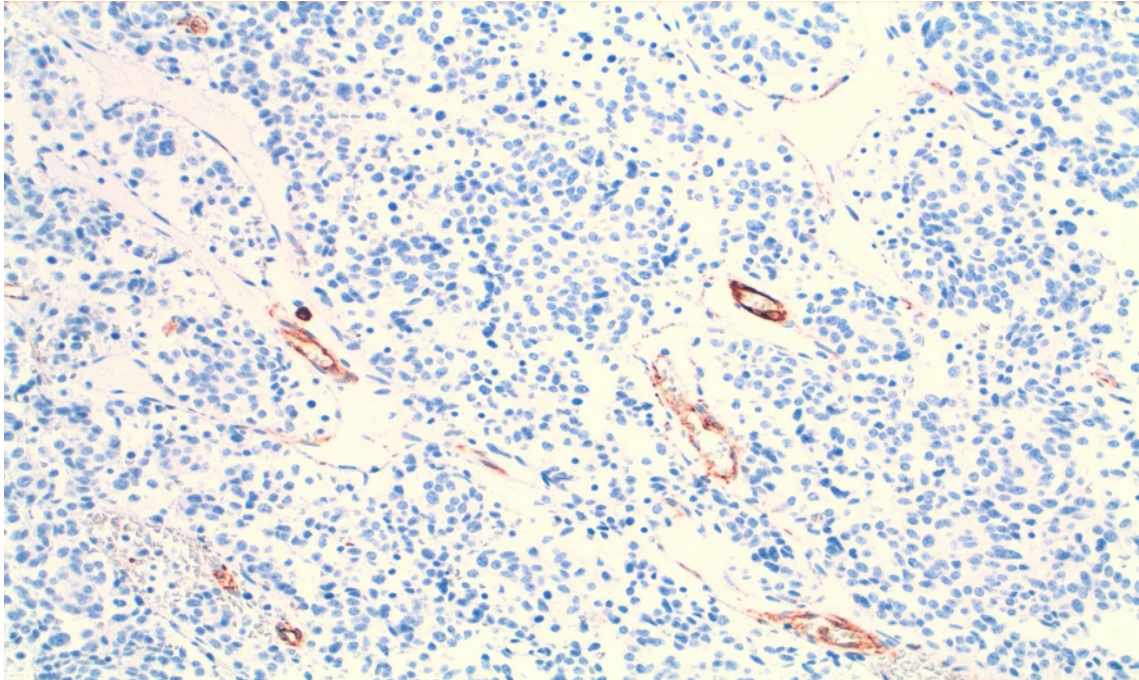


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Nicht-Anfärbung von Vimentin bei einem typischen Lungenkarzinoid (die angefärbten Areale entsprechen den Gefäßwänden) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

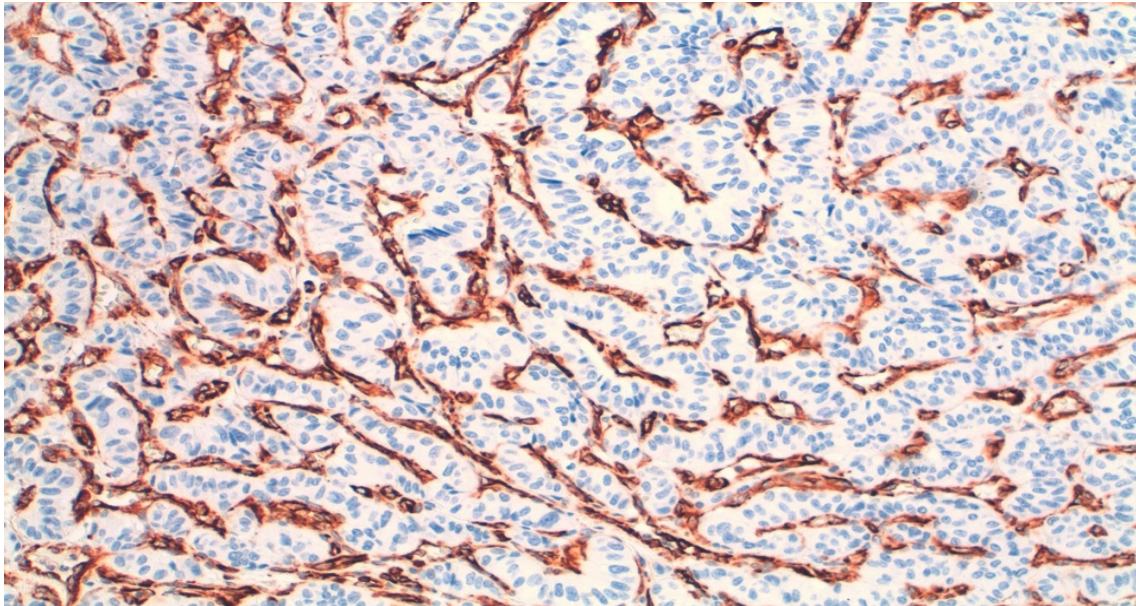


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Nicht-Anfärbung von Vimentin bei einem atypischen Lungenkarzinoid (die angefärbten Areale entsprechen den Gefäßwänden) in 200-facher Vergrößerung. (Aus dem MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie Wetzlar).

4.3 Wachstumsstudien an Zellkulturen der Zelllinie CRL-5815

Bei der hier verwendeten Zelllinie handelt es sich um Zellen eines bronchialen Karzinoids, die aus dem Tumor einer 65-jährigen Frau gewonnen werden konnten. Die Zelllinie wurde kommerziell von der Firma ATCC aus Marassas, Virginia, USA erworben. Die exakte Bezeichnung lautet NCI-H727 [H727] (ATCC® CRL-5815™).

Die Spezifikation kann unter web.expasy.org/cellosaurus/CVCL1584 im Internet eingesehen werden. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C tiefgefroren und gelagert.

Es wurde für alle Wachstumsstudien die oben beschriebene Zelllinie CRL-5815 verwendet. Nach der Aussaat der Zellen wurde in 20-stündigen Zeitintervallen (0 bis 140 Stunden) die Zellzahl mit dem X-Celligence Gerät gemessen, nachdem zum Zeitpunkt Null die Signalwegs-Inhibitoren zugegeben worden waren. Für die Ablösung der Zellen von den Kulturflaschen wurde Trypsin verwendet. Es wurden jeweils die Zellen aus vier

parallel angesetzten Kulturflaschen geerntet und gezählt. Die Zellzahlen wurden anschließend gemittelt. Jede Wachstumsstudie wurde mindestens 3-mal wiederholt, um exogene Faktoren ausschließen zu können. Des Weiteren wurden die Kulturmedien regelmäßig auf Mycoplasmen getestet, um eine exogene Beeinflussung des Zellwachstums auszuschließen.

4.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung von DNA- oder RNA-Abschnitten und ist heute eine der wichtigsten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden. Mit Hilfe der PCR wurden DNA-Abschnitte aus den Tumoren der 20 NET Patienten vervielfältigt und dann mit den entsprechenden Ergebnissen zu gesundem Lungengewebe verglichen.

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde das iScript DNA Synthesis Kit von Bio-Rad verwendet. Die PCR erfolgte dann als qPCR (Realtime quantitative PCR). Damit lassen sich Unterschiede in der Genexpression zwischen erkranktem und gesundem Gewebe nachweisen.

Die Durchführung der PCR erfolgte dann im Einzelnen nach den Angaben zur Durchführung, die den Test-Kits beilagen.

Als Kontrollreferenz zum Nachweis des korrekten Versuchsablaufs diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Dabei handelt es sich um ein Enzym, das an der Glykolyse im menschlichen Körper beteiligt ist. Die GAPDH ist außerdem an der RNA-Bindung, dem RNA-Transport, der Transkription, der DNA-Replikation und Reparatur, der Apoptose und auch an der Vesikelbewegung zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat beteiligt. Sie ist in den meisten Geweben des menschlichen Körpers vorhanden und ihr Anteil ist meist hoch und konstant. Somit hat sich GAPDH als Referenz- und Kontrollgen bei der PCR etabliert (Kozera & Rapacz, 2013).

Alle Untersuchungen erfolgten an den histologischen Präparaten der o. g. Patienten mit einem NET der Lunge.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungsergebnisse der Tumor-Signalwegsexpression als Marker bei neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Eine Aktivierung des Sonic Hedgehog (SHH) Signalwegs konnte in dieser Arbeit bei 19/20 (95 %) der untersuchten NET der Lunge mit der immunhistologischen Färbung nachgewiesen werden. Dabei variierte die Stärke der Anfärbung zwischen TC und AC. Als Kontrollgewebe dienten Präparate von gesundem Lungengewebe. Während bei dem gesunden Lungengewebe der SHH Signalweg als nicht aktiv dargestellt wurde, war die Anfärbung gegen SHH bei den atypischen Karzinoiden hochsignifikant. Auch bei den gut differenzierten typischen Karzinoiden war die Signalgebung - wenn auch schwächer - eindeutig vorhanden.

Aus den in 4.2.2.1 dargestellten exemplarischen IHC-Anfärbungen des SHH Proteins wird deutlich, dass bei den atypischen Lungenkarzinoiden der SHH in noch stärkerem Ausmaß aktiviert worden ist als bei den typischen und somit weniger malignen Tumoren. Die Aktivierung des Sonic Hedgehog Signalwegs (SHH) führte allerdings nicht, wie man es hätte erwarten können, zu einer Zerstörung von PTCH 1 auf der Zelloberfläche der NET der Lunge. Wie man aus den exemplarisch abgebildeten IHC-Färbungen gegen PTCH 1 (siehe 4.2.2.2) erkennen kann, ist das PTCH 1 Antigen in allen 3 IHC-Histologien angefärbt worden.

Das Vorhandensein von PTCH 1 konnte somit sowohl in der gesunden Lunge als auch bei TC und AC in 100 % (20/20) der untersuchten Fälle bestätigt werden, sodass man davon ausgehen kann, dass PTCH 1 nicht durch das SHH Signalprotein zerstört worden ist. Somit konnte mittels IHC bei den untersuchten NET der Lunge kein hemmender Einfluss von SHH auf das Vorhandensein von PTCH 1 nachgewiesen werden, obwohl der SHH Signalweg stark exprimiert war.

Ob das PTCH 1 aber noch biologisch aktiv war, bleibt leider ungeklärt. Anhand der nachfolgend beschriebenen IHC-Untersuchungen mit AK gegen SMO ergeben sich aber Hinweise, dass PTCH 1 nicht mehr in der Lage war, SMO aus den Zellen fernzuhalten, was für eine biologische Inaktivierung von PTCH 1 sprechen würde.

In 80 % der Fälle (16 von 20) konnte bei den untersuchten NET der Lunge eine SMO Aktivität nachgewiesen werden. Die Verteilung der untersuchten Proben von TC zu AC betrug dabei 9 zu 11.

Aus dieser starken SMO Anfärbung des Zytoplasmas lässt sich ableiten, dass SHH den PTCH 1 zwar inaktiviert, aber nicht destruiert hat, da ansonsten die SMO Anreicherung im Zytoplasma nicht so ausgeprägt angefärbt worden wäre.

Eine Überexpression von Snail 1 konnte bei 13 von 20 (65 %) der untersuchten Patienten mit NET der Lunge mit Hilfe der Immunhistologie nachgewiesen werden. Diese Snail 1 Aktivität hat aber nicht, wie es zu erwarten gewesen wäre, zu einer Subpression von E-Cadherin geführt. Überraschenderweise war die E-Cadherin Expression bei 19 der 20 untersuchten Patienten immunhistologisch unverändert vorhanden, wie sich durch die IHC-Färbungen nachweisen ließ. Diese Anfärbung trat sowohl beim gesunden Lungengewebe als auch bei den TC und den AC auf.

Eine Twist-Expression ließ sich in keiner der durchgeführten immunhistologischen Färbungen bei den untersuchten NET der Lunge nachweisen.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der E-Cadherin Expression, die in 95 % der untersuchten Fälle nicht durch Twist supprimiert worden ist.

Vimentin als Expressionsmarker einer epithelialen Neoplasie, die zur verstärkten Metastasierung führt, ließ sich lediglich in 10 % (2/20) der untersuchten NET der Lungen nachweisen. Bei beiden Tumoren, in denen Vimentin nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um atypische Karzinoide.

Die Ergebnisse der IHC-Färbungen bei den untersuchten NET der Lunge aus den Kapiteln 4.2.2.1 bis 4.2.2.7 werden in der Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Daraus wird ersichtlich, dass nur die Signalwege SHH und SMO, sowie mit Einschränkung Snail 1, als mögliche Ziele einer antitumoralen Therapie in Frage kommen, da nur sie eine signifikante tumorfördernde Expression aufwiesen.

Signalweg	Positiv	Negativ	Tumorfördernd
SHH	95 %	5 %	+
PTCH 1	100 %	0 %	Ø
SMO	80 %	20 %	+
Snail 1	65 %	35 %	(+)
E-Cadherin	95 %	5 %	Ø
Twist	0 %	100 %	Ø
Vimentin	10 %	90 %	Ø

Tabelle 6: Auflistung der untersuchten EMT Signalwegs-Expression beim NET der Lunge und ihr Einfluss auf die Tumorentwicklung.

Die Abb. 32 stellt die Ergebnisse der Signalwegs-Expression als Balkendiagramm dar. Daraus wird ersichtlich, dass die tumorfördernden Signalwege SHH, SMO und mit Einschränkung Snail 1 eine deutliche Aktivität bei den untersuchten NET der Lunge aufweisen. Die ebenfalls tumorfördernden Signalproteine Twist und Vimentin waren hingegen nicht signifikant exprimiert.

Das tumorhemmende E-Cadherin und PTCH 1 waren hingegen fast zu 100 % auf den Tumorzellen nachweisbar.

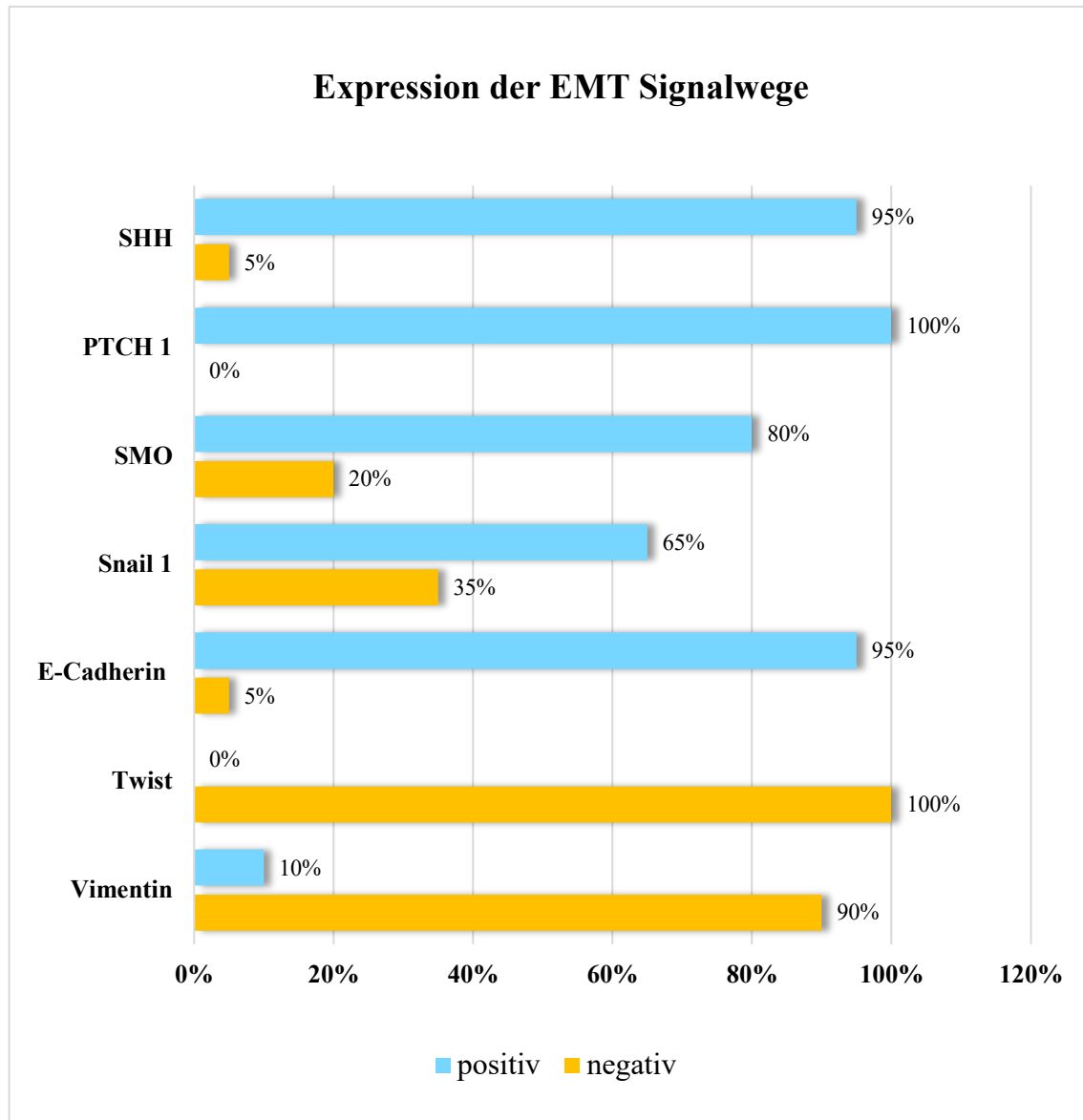


Abbildung 32: Aktivität der EMT Signalwegs-Expression bei den untersuchten NET der Lunge.

5.2 Vergleich der Ergebnisse von 4.2.2.1 bis 4.2.2.7 aufgeschlüsselt nach typischen und atypischen Karzinoiden

Bei der Analyse, ob zwischen den TC und den AC ein unterschiedliches Expressionsverhalten der EMT Signalwege vorliegt, konnten sowohl für E-Cadherin, Twist, Vimentin und für Snail 1 mittels der IHC keinerlei brauchbare Unterschiede zwischen den beiden Tumorgruppen nachgewiesen werden. Dies wird in den Tabellen 7

und 8 zur Übersicht verdeutlicht. Daraus ergibt sich, dass die IHC-Färbungen für die hier getesteten Signalwege der EMT nicht geeignet sind, um eine sichere Unterscheidung zwischen TC und AC vornehmen zu können.

Fort. Pat.-Nr.	Tumor-art	Twist	SMO	PTCH 1	Snail 1	SHH	Vim	E-Cad-herin
1	TC	-	++	+++	+	++	-	+++
2	TC	-	+++	++	+++	+++	-	+++
3	TC	-	-	+++	+++	+++	-	+++
4	TC	-	-	++	-	++	-	+++
5	TC	-	+++	+++	+++	+	-	+++
6	TC	-	++	++	+++	+	-	+++
7	TC	-	++	+++	-	++	-	+++
8	TC	-	++	++	++	++	-	+++
9	TC	-	+++	++	+++	++	-	+++
10	AC	-	+	++	-	+++	-	+++
11	AC	-	++	++	+++	++	-	+++
12	AC	-	-	++	+++	++	+	+++
13	AC	-	+++	++	-	+++	-	+++
14	AC	-	+	+++	-	+	-	+++
15	AC	-	++	++	-	-	-	+++
16	AC	-	+++	+++	++	+	+++	-
17	AC	-	++	++	+++	++	-	+++
18	AC	-	-	++	-	++	-	++
19	AC	-	+	++	+++	++	-	+++
20	AC	-	+++	++	++	+	-	++

Tabelle 7: Auswertung der Signalwegs-Aktivität bei typischen und atypischen NET mittels der IHC.

Färbeintensität: +++ *kräftig positiv*, ++ *mäßig positiv*, + *schwach positiv*, - *negativ*

Da die Beurteilung der Farbintensität bei der IHC immer als subjektiv angesehen werden muss, wurde versucht mittels des immunreaktiven Scores (IRS) in Anlehnung an Remmele und Steger eine Objektivierung zu erreichen. Diese Methodik wurde bereits im Kapitel 4.2.2 beschrieben. Sowohl aus der Tabelle 7 (Beurteilung der Farbintensität durch zwei unabhängige Pathologen) als auch aus der Tabelle 8 (Berechnung des immunreaktiven Scores) wird deutlich, dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Signalwegs-Aktivität zwischen den TC und AC ergeben. Die errechneten Punkte des IRS wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Dabei ergab sich, dass auch bei Snail 1, obwohl auf den ersten Blick ein Unterschied zwischen TC und AC besteht, keine statistische Signifikanz vorliegt.

Quantifizierung der IHC-Färbung mittels des immunreaktiven Scores

Fort. Pat.-Nr.	Tumor-art	Twist	SMO	PTCH 1	Snail 1	SHH	Vim	E-Cad-herin
1	TC	0	8	12	1	4	0	12
2	TC	0	12	8	12	12	0	12
3	TC	0	0	12	12	12	0	12
4	TC	0	0	8	0	8	0	12
5	TC	0	12	12	12	1	0	12
6	TC	0	4	8	9	3	0	12
7	TC	0	6	12	0	4	0	12
8	TC	0	8	8	6	4	0	6
9	TC	0	12	8	4	2	0	8

TC	Twist	SMO	PTCH 1	Snail 1	SHH	Vim	E-Cad-herin
Durchschnitts-score	0	6,9	9,8	6,2	5,6	0	10,9

Fort. Pat.-Nr.	Tumor-art	Twist	SMO	PTCH 1	Snail 1	SHH	Vim	E-Cad-herin
10	AC	0	3	8	0	6	0	12
11	AC	0	8	4	6	4	0	12
12	AC	0	0	8	6	4	2	12
13	AC	0	12	8	0	6	0	6
14	AC	0	3	12	0	2	0	12
15	AC	0	8	8	0	0	0	12
16	AC	0	12	12	6	4	6	0
17	AC	0	8	8	6	4	0	12
18	AC	0	0	8	0	8	0	4
19	AC	0	2	8	6	4	0	12
20	AC	0	12	8	4	2	0	8

AC	Twist	SMO	PTCH 1	Snail 1	SHH	Vim	E-Cad-herin
Durchschnitts-score	0	6,2	6,9	3,1	4,0	0,7	9,3

Tabelle 8: Immunreaktiver Score bei typischen und atypischen NET nach der IHC-Färbung in Anlehnung an Remmele und Stegner (1986).

In der Abb. 33 werden zur besseren Übersicht nochmals die Aktivitäten der Signalwege bei den untersuchten TC und AC als Säulendiagramm dargestellt. Damit wird deutlich, dass die EMT Signalwege bei den TC und AC, für die klinische Anwendung keinerlei verwertbare Unterschiede zeigen.

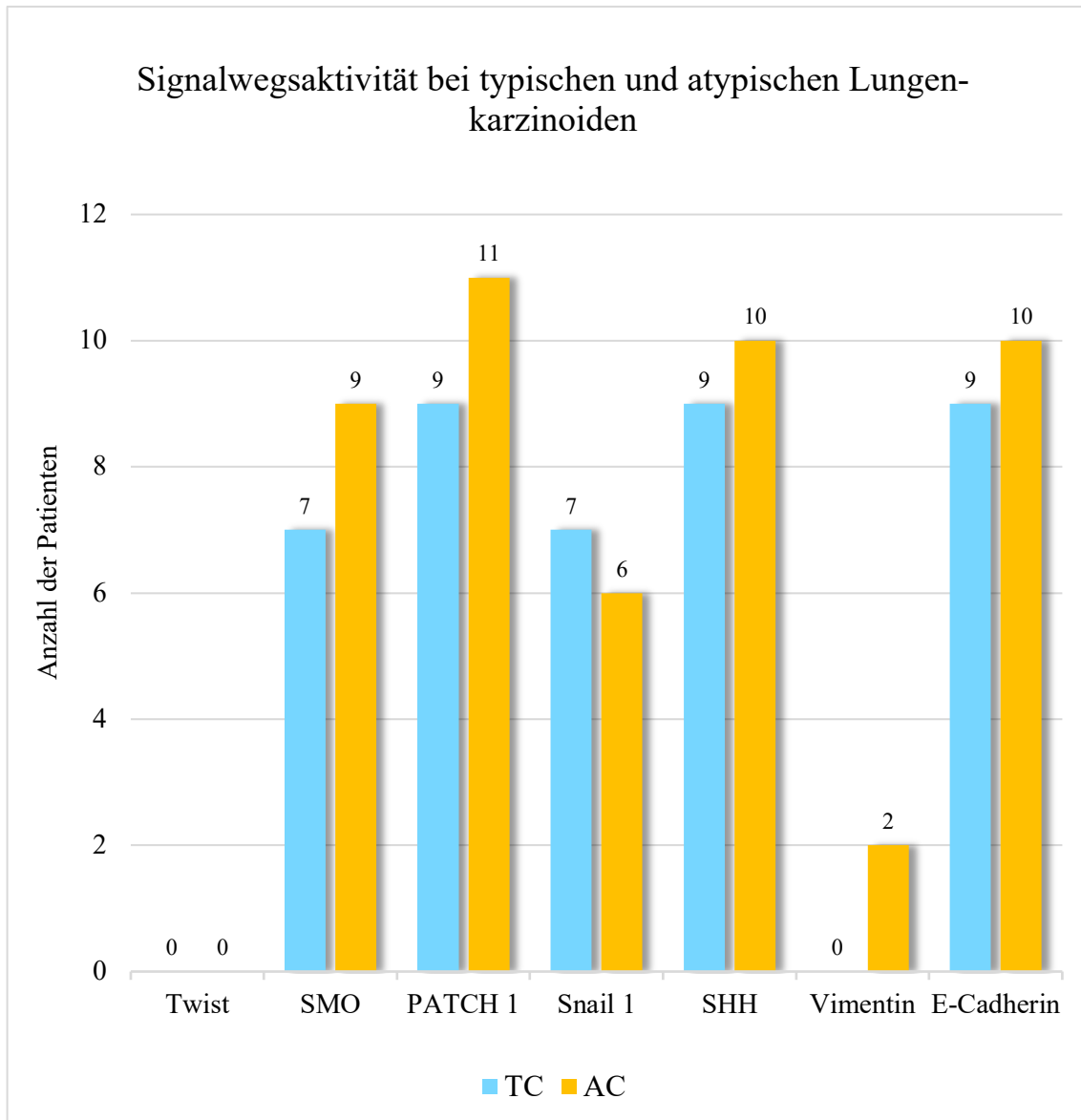


Abbildung 33: Graphische Darstellung der einzelnen Signalwegsaktivitäten im direkten Vergleich von typischen und atypischen Lungenkarzinoiden.

5.3 Wachstumsverhalten der Zelllinie CRL-5815 unter dem Einfluss von EMT Signalwegs-Inhibitoren

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren der EMT Signalwege auf das Wachstum der bronchialen Karzinoid Zelllinie CRL-5815 zu untersuchen, wurde das Zellwachstum unter Zugabe von Cyclopamin (Hedgehog-Signalweg-Inhibitor), GN25 (p53-Snail-binding-Inhibitor) und Polyethylenglycol (PEG) in verschiedenen Konzentrationen überprüft. Cyclopamin ist ein steroidales Alkaloid, das das Transmembranprotein Smoothed (SMO) hemmt und damit den SHH Signalweg unterbricht. GN25 ist ein spezifisch an p53-Snail bindender Inhibitor, der p53 abschaltet und aus den Zellen ausschleust. Somit kann es theoretisch den Zelltod und eine Wachstumsverlangsamung bei Tumorzellen bewirken. Beide Substanzen wurden bereits ausführlich als Wachstumshemmer bei Pankreaskarzinomen, Medulloblastomen und Prostatakarzinomen untersucht. Auf normale Zellen hat GN25 keine zytotoxische Wirkung (Lee *et al.*, 2009).

PEG ist ein nichttoxisches wasserlösliches Polymer, das in der Zellbiologie zur Zellfusion und somit zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) verwendet wird.

Ferner wird es zur Therapie der chronischen Obstipation eingesetzt und hat keine zytotoxischen Eigenschaften.

Wie aus der Abb. 34 ersichtlich ist, konnte der SHH-Inhibitor Cyclopamin erst ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{M/ml}$ einen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellkulturen auslösen. Aus anderen *in vitro* Versuchen von Chen ist bekannt, dass die proliferationshemmenden Prozesse an den Zellen ansonsten bereits ab einer Konzentration von 150 nM/ml erreicht werden (Chen *et al.*, 2002).

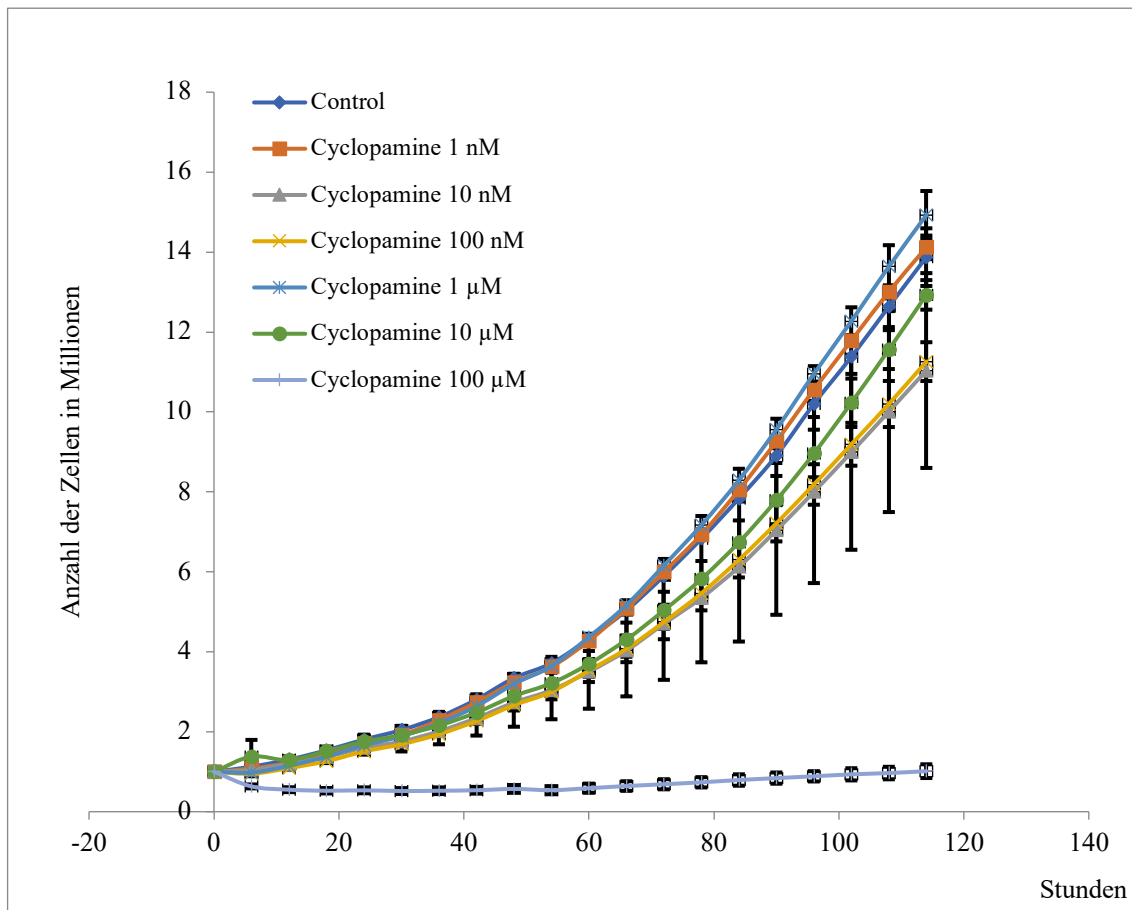


Abbildung 34: Wachstumskurven der Zelllinie CRL-5815 nach der Zugabe des SHH-Inhibitors Cyclopamin in verschiedenen Konzentrationen.

Abb. 35 zeigt das Zellwachstum nach der Zugabe von PEG. Erst ab einer Konzentration von 10 % pro ml Medium wurde das Zellwachstum, im Vergleich zur Wachstumskontrolle ohne Zusatz, signifikant gehemmt. Wie Shaffer schon 1950 festgestellt hat, sollte eine intravenöse Konzentration beim Menschen von 14 ng/kg KG aus toxikologischer Sicht nicht überschritten werden (Shaffer *et al.*, 1950).

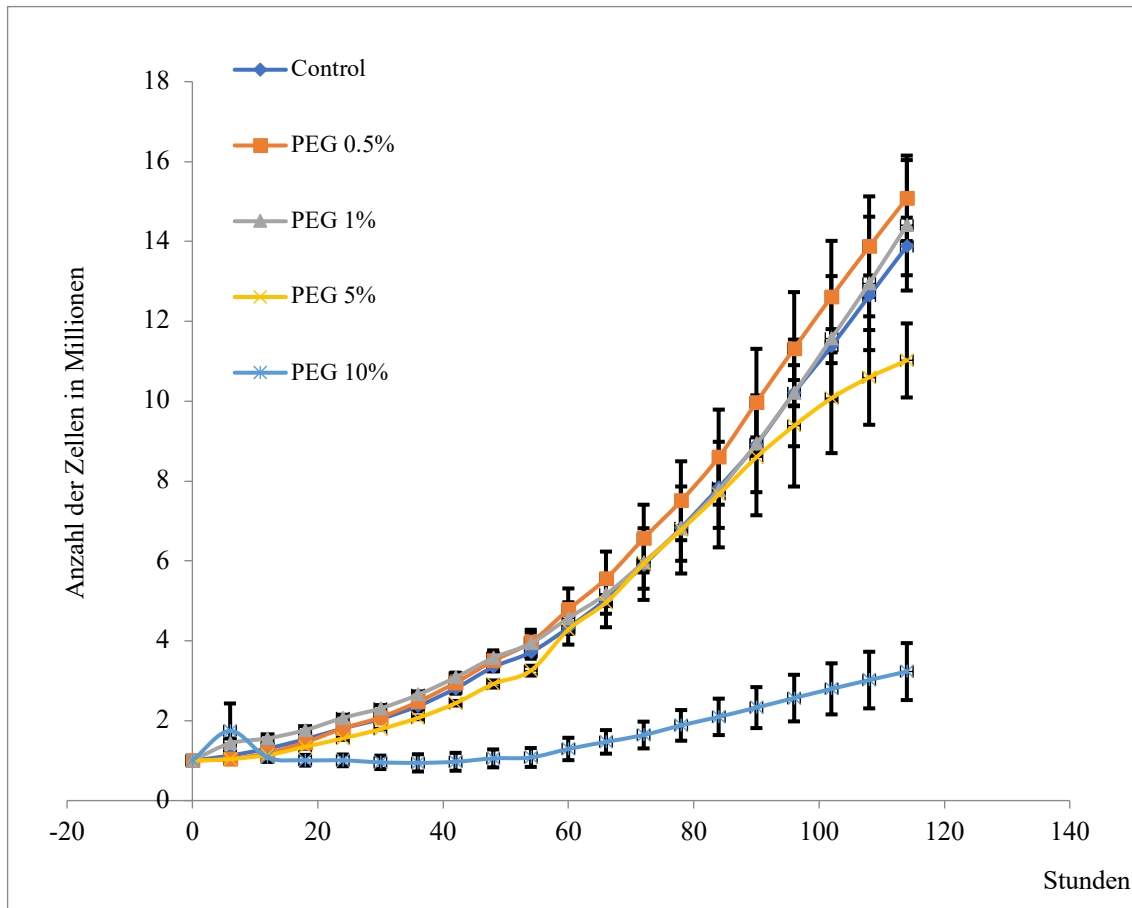


Abbildung 35: Wachstumskurven der Zelllinie CRL-5815 unter der Zugabe von PEG, in verschiedenen Konzentrationsstufen.

Der wachstumshemmende Einfluss des Snail 1-Inhibitors GN25 (siehe Abb. 36) konnte erst ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{M/ml}$ als signifikant eingestuft werden. Derartige Konzentrationen sind aber leider nicht in vivo zu realisieren.

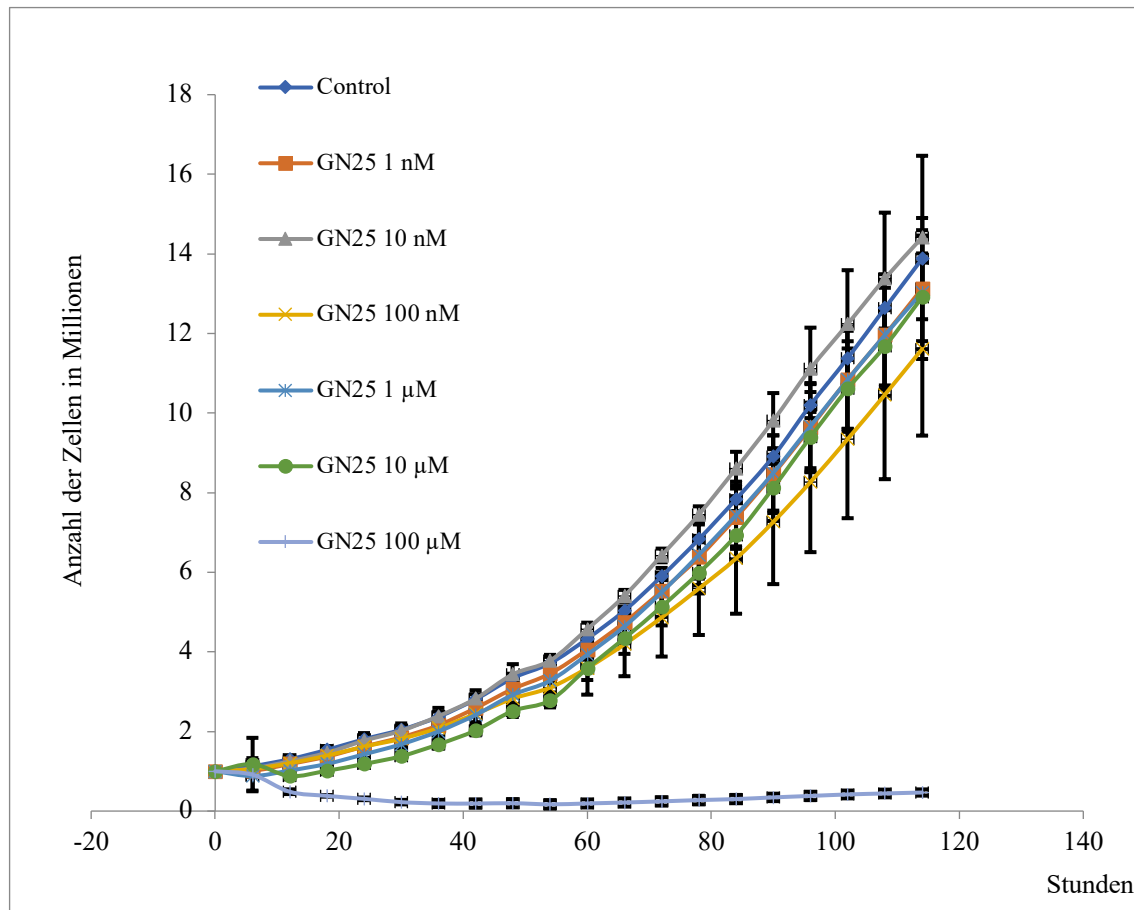


Abbildung 36: Wachstumskurven der Zelllinie CRL-5815 unter der Zugabe des Snail 1-Inhibitors GN25 in verschiedenen Konzentrationsstufen.

Wie sich aus den vorliegenden Abb. 35 und 36 ergibt, konnte in-vitro das Zellwachstum nicht durch eine Beeinflussung der EMT Signalwege Sonic Hedgehog und Snail 1 beeinflusst werden. Auch die Zugabe von PEG in möglichen physiologischen Dosen änderte nichts an dem Wachstumsverhalten der verwendeten Zelllinie.

Erst bei einer extrem hohen Konzentration der Signalwegs-Inhibitoren, die in physiologischer Weise in vivo nie erreicht werden kann, kam es bei allen drei getesteten Substanzen zu einer Wachstumshemmung der Zellkulturen. Somit ergibt sich zunächst

einmal der Hinweis, dass die Hemmung dieser beiden Signalwege bei NET der Lunge kein Ansatz für neue therapeutische Verfahren sein kann.

5.4 Untersuchungsergebnisse der Polymerase Kettenreaktion bei den EMT Signalwegen der neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) konnte bei 20 Proben von NET Patienten (das jeweilige Tumorstadium ist unter 4.1 aufgeführt) die Genaktivität des SHH Signalweges untersucht und mit dem auf 1 normierten Level von gesundem Lungengewebe verglichen werden.

Die Genaktivität von SHH, Snail 1 und Vimentin im Vergleich zur Genaktivität in gesundem Lungengewebe wird in den Abb. 37, 38 und 39 logarithmisch dargestellt. Dabei fungiert die Genaktivität für das gesunde Lungengewebe in den Graphiken als sog. Basislinie.

Obwohl die durchgeführten immunhistologischen Färbungen des SHH bei 19 von 20 (95 %) Proben positiv waren, konnte mit der PCR nur in 12 von 20 Gewebeproben eine erhöhte Genexpression des SHH (60 %) bestätigt werden.

Die Aufschlüsselung nach TC und AC ergab keine verwertbaren Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen in der Genexpression des SHH.

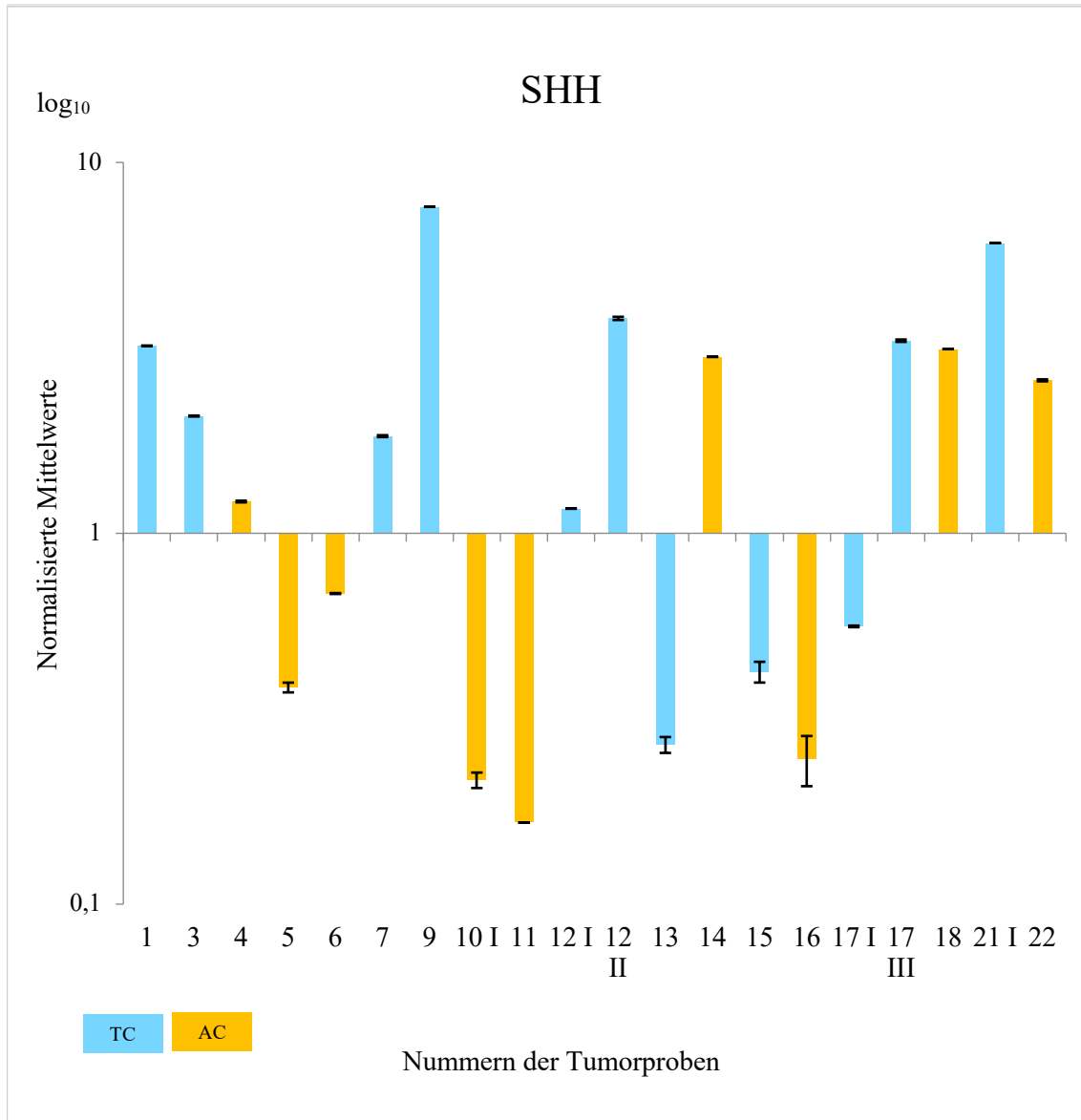


Abbildung 37: Die Genaktivität des SHH bei verschiedenen NET der Lunge (Tumorstadien s. 4.1) gegenüber dem von normiertem Lungengewebe - Basislevel 1. Die Nummern der Tumorproben entsprechen den Histologie-Nr. der Tabelle 4

Bei der Analyse der Genexpression von Snail 1 konnte de facto keinerlei Unterschied gegenüber dem Kontrolllevel des gesunden Lungengewebes nachgewiesen werden.

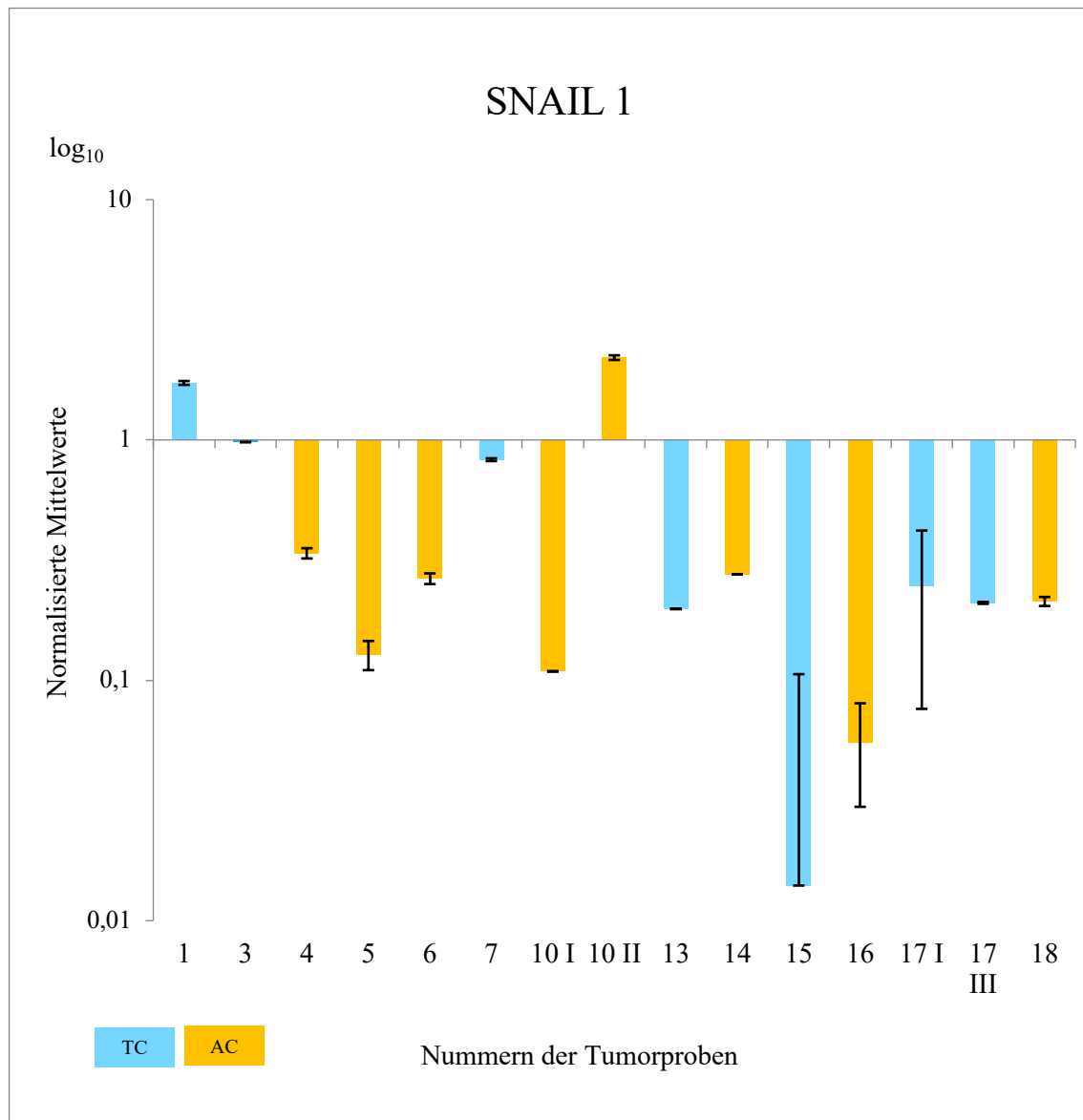


Abbildung 38: Die Genaktivität von Snail 1 war nur bei 2 von 15 untersuchten Tumorproben gegenüber dem Level von gesundem Lungengewebe verstärkt.

Auch für Vimentin ergab die PCR Untersuchung keinen Ansatz für eine unterschiedliche Genexpression im Vergleich zwischen den TC und den AC. Daraus lässt sich ableiten, dass die PCR der IHC beim Nachweis der EMT Signalwege des Lungenkarzinoids nicht überlegen ist.

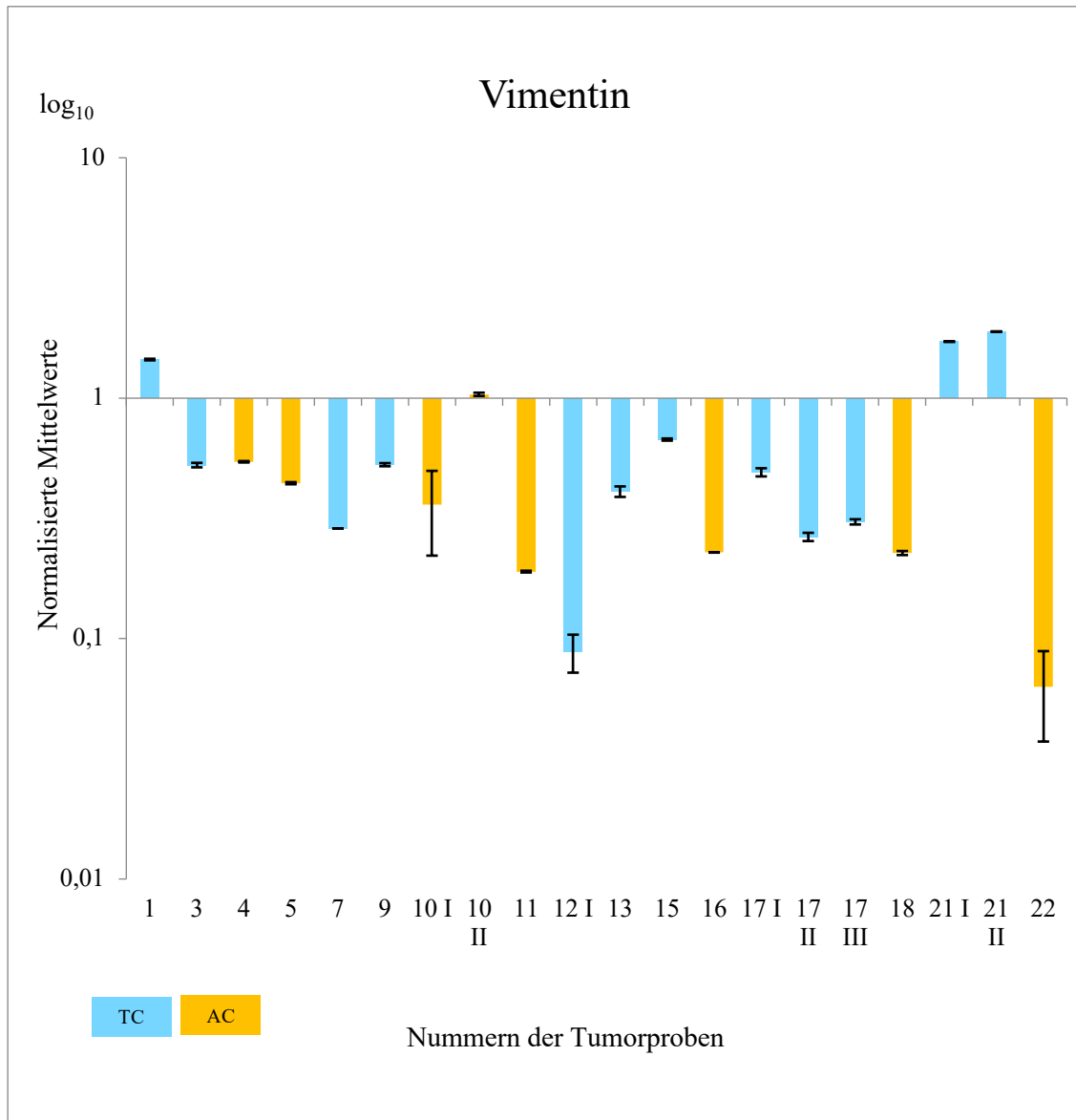


Abbildung 39: Die Genaktivität von Vimentin gegenüber dem von normiertem Lungengewebe. Hier waren 4 von 20 Proben verstärkt genaktiv.

6 Diskussion

Der bekannte Pathologe Rudolf Virchow (1821-1902), der als Begründer der Zellpathologie gilt, hatte bereits vor mehr als 150 Jahren die Theorie entwickelt, dass sich menschliche Tumoren aus den „schlafenden Resten des embryonalen Gewebes“ entwickeln, da Karzinomzellen über ähnliche Eigenschaften wie embryonale Zellen verfügen (Bauer, 2004). Wie normale menschliche Stammzellen können sich auch Tumorzellen selbst erneuern. Vor allem therapieresistente Tumorzellen neigen zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die ihre zellulären Eigenschaften deutlich verändert. EMT spezifische Signalfaktoren wie SHH, Snail 1, E-Cadherin, Vimentin und Twist steuern in bzw. auf den Zellen genetische Veränderungen, die epitheliale Zellstrukturen in mesenchymale umwandeln. Sie werden dadurch in die Lage versetzt, sich weiter zu transformieren und durch eine neu erworbene Mobilität und Loslösung aus den Zellverbänden, benachbarte Gewebe zu infiltrieren und so zu metastasieren. Diese Kaskade der EMT Signalwege bzw. Signalfaktoren ist außerordentlich komplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. So ist z. B. der Signalfaktor Snail 1 bei der Metastasierung des Mammakarzinoms ein ganz entscheidender Faktor, während er bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms bisher nicht als signifikanter Faktor identifiziert werden konnte (Brabletz *et al.*, 2018).

Bei den hier untersuchten 20 Fällen von neuroendokrinen Tumoren der Lunge konnte durch die immunhistologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass bei 19 der 20 Patienten (95 %) der Sonic Hedgehog Signalweg (SHH) aktiviert war. Dass die Beurteilung der Anfärbung mittels der IHC bei den TC und AC einer subjektiven Einordnung unterliegt, ist der Autorin dieser Arbeit sehr wohl bewusst.

Deshalb erfolgte die Auswertung der IHC-Färbungen in Zusammenarbeit mit zwei unabhängig voneinander arbeitenden Pathologen. Um einer möglichst objektiven Beurteilung nahe zu kommen, wurde die Beurteilung um den immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner erweitert.

Dieses Vorgehen wird auch von anderen Autoren angewendet und ist allgemein akzeptiert (Galván *et al.*, 2014).

Die Erzielung einer möglichst objektiven Beurteilung war auch der Grund, weshalb die Ergebnisse der IHC-Färbungen mit Hilfe der PCR überprüft wurden. Dabei stellte sich

allerdings heraus, dass die Analyse mittels der PCR nicht mit den Ergebnissen der IHC korreliert oder mit den Resultaten übereinstimmt, die nach der Sichtung der derzeitigen Literatur zu erwarten gewesen wären. Auch der Versuch mittels der PCR, eine Differenzierung zwischen den TC und AC vornehmen zu können, ergab keine schlüssigen Ergebnisse. Somit scheint die PCR zur diagnostischen Unterscheidung zwischen TC und AC bei den NET der Lunge nicht geeignet zu sein.

Eine mögliche Erklärung für diese Resultate könnten eventuelle Zellveränderungen sein, die während der Fixierung mit Formalin und der Einbettung in Paraffin bzw. durch die Alterung der Gewebeblöcke aufgetreten sind. Gustafsson fand in seiner Übersichtsarbeit z. T. erhebliche Unterschiede beim Nachweis von Signalproteinen, die an frischem Gewebe untersucht wurden, im Vergleich zu denen, die zuvor in Formalin und Paraffin fixiert worden waren (Gustafsson *et al.*, 2015). Auf derartige Probleme hatte auch schon Bellet im Jahre 2008 in seiner Arbeit hingewiesen (Bellet *et al.*, 2008). Er konnte nachweisen, dass es erhebliche Unterschiede zwischen den Proteinmustern von frisch gefrorenem Gewebe und dem in Formalin fixiertem Gewebe gibt. Inwiefern das Alter der Paraffinblöcke von Bedeutung ist, wird in der Literatur nicht einheitlich bewertet. Kroll hat beschrieben, dass mit zunehmendem Alter der Präparate der Proteinnachweis geringer ausfällt (Kroll *et al.*, 2008). In der Studie von Craven hingegen konnten bei Proben aus Nierenzellkarzinomen, über einen Lagerzeitraum von zehn Jahren keine einschränkenden Unterschiede gefunden werden (Craven *et al.*, 2013).

Die Expression von Snail 1 als Ausdruck einer EMT Aktivierung, die über eine Herunterregulierung von E-Cadherin zur Tumorgenese beiträgt, wurde bei 13 der 20 (65 %) untersuchten Fälle mittels der IHC festgestellt. Dies deckt sich mit Untersuchungen von anderen Autoren, die sich aber auf Kolonkarzinome beziehen (Kroepil *et al.*, 2012; Pěa *et al.*, 2009). Obwohl mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass das Glykoprotein Snail 1 bei 65 % aktiviert war, hatte dies aber nicht zu einer Runterregulierung von E-Cadherin geführt, was man eventuell auf eine unterschiedlich starke Verteilung von Snail 1 im Tumorgewebe zurückführen kann. Diese hohe E-Cadherin Expression steht allerdings nicht ganz im Einklang mit den Resultaten anderer Autoren, die ein Herunterregulieren von E-Cadherin beim AC nachweisen konnten (Galván *et al.*, 2014). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden,

dass in der Studie von Galván ein Komplex aus E-Cadherin und β -Catenin gemessen wurde (bei β -Catenin handelt es sich um ein intrazelluläres Protein) und die Daten somit nicht direkt vergleichbar sind.

Fendrich konnte bei neuroendokrinen Tumoren des Ileums und den daraus resultierenden Lebermetastasen nachweisen, dass die Snail 1 Expression in verschiedenen Tumorabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Fendrich *et al.*, 2007). So war die Snail 1 Expression vor allem an den invasiv wachsenden Tumorrändern und in dem Gewebe von Fernmetastasen stark aktiviert, während sie im zentralen Tumorgewebe weniger stark aktiviert war.

SHH hingegen ist weitaus diffuser im Tumorgewebe nachweisbar. Diese diffuse Verteilung von SHH im Tumorgewebe lässt deshalb auch eine SHH-Antikörpertherapie sinnvoller erscheinen als eine Therapie, die sich gegen Snail 1 richtet, da dieses, wie beschrieben, hauptsächlich an der Tumorfront nachweisbar ist.

Diese Überlegungen decken sich auch mit den in vitro Untersuchungen an Zellen des menschlichen Gallengangkarzinoms, bei denen das Zellwachstum durch die Hemmung des SHH Signalweges signifikant reduziert werden konnte (Riedlinger *et al.*, 2014).

In der klinischen Praxis findet diese SHH-Hemmung bereits bei Patienten mit fortgeschrittenen Basalzellkarzinomen Anwendung, bei denen mit Sondidegib ein oraler Antagonist des SHH Signalwegs zur Verfügung steht.

Eine Expression von Vimentin war im Rahmen dieser Arbeit nur bei 2 der 20 untersuchten Patienten (10 %) mittels der IHC nachweisbar.

Obwohl Vimentin – wenn es verstärkt exprimiert wird – ein wichtiger Faktor bei der Tumorgenese und der Metastasierung bei anderen Tumoren sein kann (Satelli & Li, 2011), wurde bei den untersuchten NET der Lunge nur bei 2 von 20 Patienten (10 %) eine Vimentin Expression festgestellt. Da Vimentin unbestritten als ein Marker für die Metastasierung und die Tumorgenese gilt, wäre theoretisch zu erwarten gewesen, dass der Prozentsatz der Vimentin positiven Fälle signifikant höher ausfällt, wenn es bei der EMT der NET der Lunge eine entscheidende Rolle spielen würde.

Auch wenn es sich hier nur um eine kleine Fallzahl handelt, zeichnet sich doch ab, dass Vimentin bei der Entstehung der NET der Lunge keine so signifikante Rolle spielt, dass sich daraus ein diagnostischer oder therapeutischer Ansatz ableiten ließe.

Somit fällt Vimentin auch als diagnostischer Marker bei der Unterscheidung zwischen TC und AC aus. Deshalb scheinen bei den hier untersuchten NET der Lunge andere Signalwege bei der Tumorprogression und der Metastasierung im Vordergrund zu stehen. Aus den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich ferner ableiten, dass die neuroendokrinen Tumoren der Lunge und zwar sowohl die TC als auch die AC eine Sonderstellung bei der EMT einnehmen. Anders als z. B. beim Pankreaskarzinom, dem Kolonkarzinom, dem Glioblastom oder dem Mammakarzinom sind die EMT Signalwege bei den NET der Lunge anscheinend nicht in typischer Weise aktiviert bzw. folgen nicht in typischer Weise dem bekannten Kaskadenweg. Wie auch von Sari in ihrer umfassenden Übersichtsarbeit dargelegt worden ist, gilt dies speziell für den SHH Signalweg (Sari *et al.*, 2018). Dessen bekannter Hauptaktivierungsweg besteht in seiner Bindung an PTCH 1 und der daraus folgenden Inaktivierung von PTCH 1. Durch diese Abschaltung von PTCH 1 kann SMO verstärkt in die Zelle eingeschleust werden, in der es dann im Zellkern die Genexpression des GLI 1 Transkriptionsfaktors aktiviert. Das GLI 1-Gen wurde ursprünglich als Onkogen beim malignen Gliom beschrieben. Heute sind drei GLI Proteine bekannt, die unterschiedliche regulatorische Effekte auf die Transkription haben. So übt GLI 3 ohne die SHH Aktivierung eine Repressor-Funktion in der Zelle aus, und erst nach der Einschleusung von SMO in den Zellkern wird es in seine aktive Form überführt (Carballo *et al.*, 2018).

Ein weiterer und bisher noch nicht vollständig aufgeklärter Weg der SHH Kaskade läuft ohne die Einschleusung von SMO in die Zelle ab. Dabei wird die Interaktion von PTCH 1 und Cyclin B1 unterbrochen, was dann zu einer direkten Zellproliferation und dem Verlust der Apoptose führt (Carballo *et al.*, 2018). Dieser Signalweg scheint auch bei der Entwicklung der Tumoresistenz gegenüber Chemotherapeutika von Relevanz zu sein.

Die Rolle von PTCH 1 bei der Entstehung und Progression der NET der Lunge ist nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen somit weiterhin nicht eindeutig geklärt, da es in allen untersuchten Fällen nachweisbar und somit auch durch das stark exprimierte SHH nicht von der Zelloberfläche verschwunden war. Weil aber das von PTCH 1 beim Gesunden weitgehend supprimierte SMO verstärkt in den untersuchten Tumoren vorkam, könnte der PTCH 1 Rezeptor zwar noch auf der Zelloberfläche vorhanden, aber biologisch nicht mehr aktiv sein. Daraus ergibt sich die noch offene Frage, inwiefern das

Protein Cubitus interruptus (Ci) in den Tumorzellen bei den NET der Lunge eine Rolle spielt. Wesentlich wahrscheinlicher ist es aber, wie oben ausgeführt wurde und Untersuchungen von Sari gezeigt haben, dass es vermutlich einen zweiten SHH Signalweg gibt, der nicht zwingend PTCH 1 abhängig ist und von ihr als „Non-canonical Hedgehog Pathway“ beschrieben wird (Sari *et al.*, 2018). Dieser Signalweg wird wohl nicht von Transkriptionsfaktoren aus der GLI-Familie gesteuert und betrifft hauptsächlich sogenannte Krebsstammzellen (CSC, cancer stem cells). Dieser „Non-canonical“ SHH Signalweg ist somit PTCH 1 unabhängig und könnte so die intrazelluläre Anwesenheit von SMO erklären. Dies könnte auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten plausibilisieren, die aussagen, dass 16 von 20 Patienten SMO positiv waren.

Neben PTCH 1 existiert mit PTCH 2 außerdem ein weiteres Transmembran-Protein, das mit ihm eine Übereinstimmung von 57 % aufweist, aber eine etwas andere Expression und Wirkungsweise hat (Rahnama *et al.*, 2004). Es hemmt aber die Einschleusung von SMO nicht so stark wie PTCH 1, wenn SHH nicht aktiviert ist.

Die Interaktion von SHH mit anderen Signalwegen ist zunehmend ein Untersuchungsgegenstand der letzten Jahre. Dabei stellte sich heraus, dass es signifikante Interaktionen zwischen den verschiedenen Signalwegen wie z. B. Wnt, TGF- β und EGFR gibt. Die Komplexität dieser Signalwege wird auch durch andere Untersuchungen belegt. Savani konnte z. B. beim NSCLC mittels der IHC nachweisen, dass die Expression von PTCH 1 zu 100 % negativ ausfiel, obwohl die SHH Expression nur bei 38 % der Patienten nachweisbar war (Savani *et al.*, 2012). Diese Arbeitsgruppe konnte keine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf und der Aktivierung des SHH Signalwegs nachweisen (Savani *et al.*, 2012).

Eine Twist Expression konnte in keinem der hier untersuchten Fälle mit einem NET der Lunge nachgewiesen werden. Dieser fehlende Nachweis von Twist (0/20) ist ein weiterer Beleg dafür, dass die NET der Lunge eine Sonderrolle bei den Lungentumoren spielen. Bei anderen Tumoren, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, dem Endometriumkarzinom, dem Leberzellkarzinom und dem malignen Melanom wurde ein Zusammenhang zwischen der Twist Expression und einer schlechten Überlebensrate nachgewiesen (Chou & Yang, 2015).

Twist hat somit bei den untersuchten NET der Lunge auch keinen Einfluss auf die Runterregulierung von E-Cadherin, da dies bei 19/20 Tumoren aktiv war.

Die Nicht-Expression von Twist bei den untersuchten Patienten steht somit im Einklang mit der positiven Expression von E-Cadherin. Obwohl Twist als ein wichtiger Regulator der EMT gilt, der die Metastasierung induzieren und E-Cadherin herunterregulieren kann, wurde es im Rahmen dieser Untersuchungsreihe bei keinem der NET Patienten immunhistologisch nachgewiesen. Dies betraf sowohl Patienten mit einem TC als auch Patienten mit einem AC und den Fällen, in denen Lymphknoten- und Fernmetastasen vorlagen.

Somit lässt sich die im Kapitel 2.6 aufgeworfene Frage nach dem sinnvollen Einsatz von Anti-Twist Substanzen zur Therapie von NET der Lunge als nicht erfolgversprechend verwerfen.

Dies verdeutlicht einmal mehr, dass die NET der Lunge eine Sonderrolle bei den Lungentumoren spielen, denn die Metaanalyse von NSCLC Patienten aus 5 Studien ergab, dass bei diesem Typ von Lungentumoren eine schlechte Prognose mit dem Ausmaß der Twist Expression assoziiert war (Zeng *et al.*, 2015).

Bei den hier untersuchten NET der Lunge konnte hingegen, wie auch beim NSCLC, nachgewiesen werden, dass der SHH Signalweg und SMO bei der Tumorgenese bzw. der Metastasierung mittels der EMT von herausgehobener Bedeutung sind, während die Bedeutung der anderen Signalwege bei diesem Tumor eher sekundärer Art ist.

So war ein anderer Signalweg, nämlich das tumor-protective E-Cadherin, in den 20 untersuchten Proben nicht herunterreguliert, sondern in 95 % der Fälle nachweisbar.

Wie kompliziert die Verhältnisse somit wirklich sind, machen die Einzelergebnisse der Signalwege bei den untersuchten Tumoren deutlich.

Bei 19 von 20 untersuchten Patienten mit einem NET der Lunge war der Hedgehog Signalweg laut Nachweis mittels der IHC aktiviert. Dies hätte nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand zu einer Herunterregulierung von PTCH 1 führen sollen. Bei den hier untersuchten NET-Fällen war aber PTCH 1 in allen 20 Fällen unverändert auf der Zelloberfläche vorhanden. Das SMO hingegen, das von PTCH 1 supprimiert sein sollte, war in 80 % der Fälle erhöht nachweisbar. Dies stützt die Theorie, dass zwischen dem Vorhandensein eines Membranproteins und seiner biologischen Aktivität ein erheblicher Unterschied bestehen kann bzw. dass ein zweiter „non-canonical“ Signalweg existiert.

Aus den Daten der IHC lässt sich ableiten, dass therapeutische Ansätze gegen den SHH Signalweg und gegen das SMO, zur Behandlung der fortgeschrittenen NET der Lunge, am vielversprechendsten wären. Dagegen spricht allerdings, dass die in vitro Untersuchungen an der Bronchialkarzinoid-Zelllinie CRL-5815 in physiologischen Dosierungen keine Wachstumshemmung durch den SHH Inhibitor Cyclopamin zeigen konnten. Allerdings ist seit längerem bekannt, dass die Zelllangzeitkulturen nicht immer die realen Bedingungen widerspiegeln, da es bei der Langzeitpassage zu Mutationen und Veränderungen am Phänotyp kommen kann (Nicolson, 1984).

Als antitumoraler medikamentöser Therapieansatz wurde bisher in klinischen Phase I oder II Studien hauptsächlich SMO als Ziel ausgewählt. Dabei wurden zur Behandlung des Pankreaskarzinoms die SMO-Inhibitoren „Saridegib“ oder „Sonidegib“ verwendet, ohne dass aber die Behandlungsdaten bisher auf einen echten Therapiedurchbruch hinweisen (Stathis *et al.*, 2017).

Diese Arbeitshypothese ist auch unter dem Aspekt interessant, dass die EMT einen ganz entscheidenden Einfluss auf das Resistenzverhalten von Tumoren gegen die Behandlung mit Chemotherapeutika hat (siehe Kapitel 2).

Obwohl bei den in vitro durchgeführten Zellproliferations-Studien der Mediumzusatz von Cyclopamin bei der getesteten Bronchialkarzinom-Zelllinie in physiologischen Dosierungen ohne wachstumshemmenden Einfluss war, erscheint der Therapieansatz einer SHH-Hemmung anhand der anderen Untersuchungsergebnisse trotzdem eine aussichtsreiche Methode zu sein.

Dass die medikamentöse Beeinflussung der EMT Signalwege zur Tumorbehandlung ein vielversprechender Therapieansatz ist, ergibt sich auch aus der Nebenwirkung von Metformin (Du & Shim, 2016). Metformin kann die Expression von Twist und Vimentin supprimieren und somit durch eine Hemmung der EMT einen antitumoralen Einfluss ausüben. Dies wurde sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Ovarialkarzinom in vitro nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2015).

6.1 Einschränkungen der Methodik

Wie bereits in der Diskussion (Kapitel 6) erwähnt, sollen nun nochmals mögliche Einschränkungen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden hinterfragt werden. Da es sich hier nur um eine kleine Fallzahl von Patienten gehandelt hat, können die Ergebnisse nur mit Einschränkungen als gesichert angesehen werden. Zur Absicherung der erzielten Resultate wäre die Durchführung einer größeren und institutsübergreifenden Studie sinnvoll.

Die Präparate sollten, dann bei einer größeren Fallzahl, auch möglichst zeitnah und ohne weitere Fixierung den IHC-Untersuchungen bzw. der PCR unterzogen werden.

Die Problematik der subjektiven Beurteilung der IHC-Färbungen ist trotz der Anwendung des immunreaktiven Scores (IRS) leider ein noch nicht vollständig gelöstes Problem. Zwar kann mit der Anwendung des IRS nach Remmele und Stegner eine gewisse Objektivierung erzielt werden, aber der menschliche Faktor, der auch z. B. bei der histologischen Klassifikation anderer Karzinome immer wieder zu kontroversen Diskussionen führt, kann derzeit nicht sicher ausgeschlossen werden.

Bei der Messung der Wachstumskurven unter dem Einfluss von Tumor-Signalwegs-Inhibitoren sollten in weiteren Studien mehrere verschiedene Zelllinien verwendet werden, um eine isolierte Chemo-Resistenz dieser einen spezifischen Zelllinie ausschließen zu können.

6.2 Ausblick

Um die besten Ansatzpunkte für eine antitumorale Therapie der NET der Lunge herauszufiltern, bedarf es weiterer umfangreicher Studien, die sowohl die Grundlagenforschung auf der Ebene der EMT Signalwege als auch die Ebene der antitumoralen Wirkstoffe umfassen. So scheint es sinnvoll, die Aktivität der EMT Signalwege möglichst an frischem und unfixiertem Tumormaterial in prospektiven Studien zu untersuchen. Mit diesem Vorgehen lassen sich die negativen Einflüsse, die bei der Fixierung des Tumorgewebes entstehen können, vermeiden. Um größere Fallzahlen

zu erreichen, sollte ferner versucht werden, eine multizentrische Studie zu etablieren, die das Ziel hat, diese Fragen weiter zu bearbeiten.

Mit einem derartigen Vorgehen ließe sich in einem überschaubaren Zeitrahmen überprüfen, inwiefern die Untersuchungen an altem und fixiertem Tumormaterial der Realität *in vivo* entspricht.

Da dies aber erfahrungsgemäß in Deutschland nur schwer realisierbar ist, wäre der nächste Schritt, die Forschungsarbeiten von Tolani aufzugreifen und SHH-Antikörper im Mausmodell bezüglich ihrer Wirksamkeit gegen NET der Lunge zu testen (Tolani *et al.*, 2018). Da dies beim Lungenkarzinom bereits erfolgreich war, ist dies eine vielversprechende Arbeitsgrundlage.

7 Zusammenfassung

Die wesentliche Fragestellung dieser Arbeit bezog sich darauf, welche EMT Signalwege bei den neuroendokrinen Lungentumoren eine signifikante Rolle spielen, und somit als mögliches therapeutisches Ziel von Bedeutung sind. Dazu wurde mittels der IHC die Aktivität der EMT Signalwege SHH, SMO, PTCH1, Twist, Vimentin, Snail 1 und E-Cadherin bei typischen und atypischen Lungenkarzinoiden untersucht. Die IHC-Untersuchungen erfolgten an den histologischen Präparaten von 20 Patienten mit einem gesicherten NET der Lunge. Dabei lagen 9 TC und 11 AC vor. Außerdem wurde anhand dieser Präparate untersucht, ob die etablierte IHC-Färbemethodik bei der Unterscheidung zwischen TC und AC sinnvoll durch die PCR ergänzt oder ersetzt werden kann.

Bei 19 der 20 Patienten konnte mit Hilfe der IHC gezeigt werden, dass der Hedgehog Signalweg (SHH) ubiquitär im Tumorgewebe der NET der Lunge aktiviert war. Dies könnte deshalb in Zukunft ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antitumoraler Medikamente auf der Basis von SHH-Inhibitoren sein. Bei allen 20 untersuchten NET Patienten wurde ferner nachgewiesen, dass der PTCH 1-Komplex zwar noch vorhanden, aber in seiner Aktivität supprimiert war. Dies ergibt sich aus dem intrazellulären Nachweis von SMO, dass bei gesunden Zellen von PTCH 1 gesteuert wird, aber hier in 80% der untersuchten Fälle positiv war. Somit scheint die Aktivierung des SHH am wahrscheinlichsten über einen zweiten von PTCH 1 unabhängigen Signalweg zu laufen. Der hohe Prozentsatz beim SMO Nachweis bei den untersuchten NET der Lunge zeigt, dass auch dieser Baustein des EMT Signalweges ein mögliches Ziel einer zukünftigen antitumoralen Therapie sein kann.

Die fehlende Aktivität von Twist bei allen 20 untersuchten Patienten zeigt hingegen, dass dies, ebenso wie PTCH 1, kein entscheidender Signalweg bei der Entstehung bzw. der Progression von NET der Lunge ist. Dies wird auch durch die nur geringe Expression von Vimentin bei 2 der 20 Patienten bestätigt. E-Cadherin war bei fast allen (19/20) NET Patienten unverändert aktiv, sodass es ebenso wie Vimentin und Twist, bei der Tumorgenese der NET nur von untergeordneter Bedeutung ist, da es nicht supprimiert worden war.

Die vorliegenden Daten haben ferner ergeben, dass die PCR der IHC bei der Abgrenzung eines TC von einem AC nicht überlegen ist bzw. bei den hier untersuchten Fällen zu keinen besseren Ergebnissen geführt hat.

Mit Hilfe von Wachstumskurven der Bronchialkarzinoid Zelllinie CRL-8515 wurden EMT Signalwegs-Inhibitoren in vitro auf ihre antitumorale Wirkung untersucht. Der in vitro Einfluss der getesteten EMT-Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten der Bronchialkarzinoid Zelllinie CRL-5815 war leider ohne signifikante Effekte, sodass sich daraus keine therapeutischen Ansatzpunkte ableiten lassen.

Diese Arbeit zeigt, dass Substanzen, die sich gegen den SHH Signalweg bzw. gegen SMO richten, eine neue antitumorale Therapie beim fortgeschrittenen NET der Lunge sein können. Das von der FDA als erster SHH Signalwegs-Inhibitor zur Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassene Vismodegib könnte somit auch bei den AC der Lunge zur Anwendung kommen. Um dies zu überprüfen, würden sich für die Zukunft zunächst Untersuchungen im Xenograft-Mausmodell anbieten.

8 Summary

The core question of this study was to clarify which EMT signaling pathways play a significant role in neuroendocrine lung tumors and are therefore of importance as a possible therapeutic target. Thus, the activity of the EMT signaling pathways SHH, SMO, PTCH1, Twist, Vimentin, Snail 1 and E-Cadherin in typical and atypical lung carcinomas was investigated using IHC. Histological samples of 20 patients with secured lung NET were used for IHC analysis. Out of the available 20 samples, there were 9 TC and 11 AC. In addition, these samples were used to investigate whether the established IHC staining method can be replaced by PCR to differentiate between TC and AC.

It has been shown, in 19 of the 20 patients, that the hedgehog signaling pathway (SHH) was ubiquitously activated in the tumor tissue of lung NET. This could be a starting point for the development of new antitumor drugs based on SHH inhibitors in the future. In all 20 NET patients examined, it was also proven that the PTCH 1 complex was still present but its activity was suppressed. This is due to the intracellular detection of SMO, which is directed by PTCH 1 in healthy cells, but was positive in 80% of the cases studied. Thus, the activation of SHH seems to occur via a second, PTCH 1 independent pathway. The high percentage of SMO detection in the examined lung NET makes this component of the EMT signaling pathway a potential target for future antitumor therapy.

The non-activity of Twist in all 20 patients however shows, that, like PTCH 1, it is not a decisive signaling pathway in the development or progression of pulmonary NET. This is also confirmed by the low expression of vimentin in 2 of the 20 patients. E-Cadherin was not affected in almost all (19/20) NET patients. In conclusion, E-Cadherin, as well as vimentin and twist, is only of minor importance in the tumorigenesis of NET, since it was not suppressed.

Results have also shown, that PCR of the IHC is not superior in differentiating a TC from an AC or did not lead to better results in the cases examined here.

Using growth curves of the bronchial carcinoma cell line CRL-8515, EMT signaling pathway inhibitors were investigated in vitro for their antitumor effect. Unfortunately, the in vitro influence of the tested EMT inhibitors on the growth behavior of the bronchial carcinoma cell line CRL-5815 did not show any significant effects, so that no therapeutic approaches can be derived from this.

This work shows, that substances directed against the SHH signaling pathway or SMO can be an antitumor therapy for advanced NET of the lung. Vismodegib, the first SHH signaling pathway inhibitor approved by the FDA for the treatment of small cell lung cancer, could therefore also be used for the AC of the lung. In order to verify this, future investigations in the xenograft mouse model would be useful.

9 Auflistung der verwendeten Materialien

9.1 Chemikalien und Medien

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>	<u>Artikelnummer:</u>
ABC (Avidin-Biotin-Complex) Kit – Goat IgG	Vector Laboratories	PK-4005
ABC (Avidin-Biotin-Complex) Kit – Rabbit IgG	Vector Laboratories	PK-4001
Bovine fetal serum	Biochrom AG	S0615
Citric acid	Sigma Aldrich	C0759-500G
Cryosure DMSO > 99,9 %	WAK-Chemie Medical	WAK-DMSO-10
DAK-SYNAP	Dako	M7315
Dako Liquid DBA + Substrate Chromogen System	Dako	K3468
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco	14190-094
Ethanol absolut	Otto Fischer GmbH	7128094
GN25	Calbiochem	506170
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth	T865.2
Isopropanol	Sigma Aldrich	83276-250G-F
Methanol Rotidry > 99,9 %	Roth	AE01.2
Mykoplasmen-Kit	Qiagen viral mini Kit	52904
Natronlauge 2N	Roth	T135.1
PBS Tablets – Phosphate-Buffered Saline	Gibco	18912-014
PEG 3350	Sigma Aldrich Life Science	83276-250G-F
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories	P11-010
Pufferlösung ph 7,0 +/- 0,02	Roth	A518.1
Roti-Histokitt II	Roth	T160.1

Wasserstoffperoxid 30 %	Roth	8070.1
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibson	25300-054
Tween 20	Roth	9127.1

9.2 Rezepturen für selbst hergestellte Lösungen und Medien

1. PBST 0,1 %
 - 500 ml PBS (gebrauchsfertig) + 500 µl Tween 20
2. Blocking solution
 - 10 % BSA (Bovine Serum Albumin) -> 1 g BSA in 10 ml PBST gelöst
3. Peroxid (H₂O₂) 3%ig
 - 20 ml 30 % H₂O₂ + 180 ml dH₂O
4. Sekundäre Antikörper (Rabbit, Goat)
 - 1:250 verdünnen in PBST + BSA 10 %
 - 1000 µl PBST + 4 µl sekundärer AK
5. Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC)
 - 1000 µl PBST + 12 µl A + 12 µl B
6. DAB
 - 1 Tropfen (20 µl) pro 1 ml DAB-Puffer
7. Citratpuffer
 - 2,1 g Citrat x H₂O + 1 Liter dH₂O -> auf pH 6,0 (+/- 0,2) titrier

9.3 Geräte

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>	<u>Artikelnummer:</u>
Analysewaage – ABS 80-4	Kern	WB 1120023
Brutschrank - CO ₂ -Incubator Heracell 150i	Heraeus	

Brutschrank - Heraeus Function Line – B12 / 4B12	Thermo Electronic Corporation	50045046
Destillierungsanlage	Sartorius biotech	S/N 13700043
Elektrische Pipettierhilfe - Pipetboy 2	Integra	155 022
Gefrierschrank – Ultra Low	Sanyo	3611.22
Heiz- und Kälteblock – Themocell Cooling & HeatingBlock – CHB-202	Bioer Technology	CHB-202
Laborkocher	Schott Instruments GmbH	00998614
Laminarflow / Sterilwerkbank - Telstar Bio-II-A	Telstar	32998
Magnetrührer	Heidolph	50310
Mikroskop Labor Lux S	Leitz	20-505.030
Mikroskop - TMS	Nikon	302052
Minizentrifuge / Vortex - FVL-2400N Combi-Spin	Biosan	010202-1110-1085
pH-Meter – Accumet Basic	Fisher Scientific	9879
Pipette Discovery Comfort 0,1- 2 µl	HTL	4042
Pipette - Research 0,5-10 µl	Eppendorf	3123000020
Pipette - Research 10-200 µl	Eppendorf	3123000012
Pipette - Research 100-1000 µl	Eppendorf	3123000062
Rüttler MS1 Minishaker	IKA	03.004017
Sicherheitswerkbank - Herasafe	Heraeus	HS 12
Vortex – Genie 2	Scientific Industries	SI-0236
Waage Explorer	Heraeus	490203
Wasserbad - TW20	Julabo	9550120
Zentrifuge - 5425	Eppendorf	5405IG605415
Zentrifuge - GS-15R	Beckman	3239

9.4 Glas- und Plastikwaren

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>	<u>Artikelnummer:</u>
96 Well Cell Culture Plate	Cellstar	655160
Deckgläser 24 x 24 mm – Menzel-Gläser	Thermo Scientific	6200747
Eppendorf Cups 1,5 ml	Sarstedt	72.706
Falcon Tube 15 ml	Sarstedt	62.554.512
Falcon Tube 50 ml	Sarstedt	62.547.254
Färbezylinder	Scherf	122220
Filter Tips (200 µl, 1250 µl)	Biosphere	70.1189.215
Neubauer Zählkammer	Brand	717805
Objektträger – Superfrost – Menzel-Gläser	Thermo Scientific	9161110
Pipettenspitzen (0,1 µl-2,5 µl, 0,5 µl- 10 µl, 10 µl-100 µl, 50 µl-200 µl, 100 µl-1000 µl)	Sarstedt	70.760.502
Reagenzienreservoir – StarTub 55 ml	Starlab	E2310-1010
Regiergefäß SafeSeal (1,3 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt	72.706.400
Serologische Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 30 ml)	Sarstedt	86.1253.025
Sterilfilter Millex-GS	Millipore	SLGS 025 OS
Thin walled PCR Tube 0,2 ml - Genomics SP-0018	GeneOne	00251763
Tip StackPack (10 µl, 200 µl, 250 µl	Sarstedt	70.760.452
Tissue Culture Flask – T25, T75, T175	Sarstedt	83.3910.002

10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: FRISCHES OPERATIONSRESEKTAT DES LINKEN LUNGENUNTERLAPPENS EINES 19-JÄHRIGEN MANNES MIT EINEM ENDOBRONCHIAL LOKALISIERTEN 2,2 CM GROßEN, SOLIDEN, TRABEKULÄR WACHSENDEN TUMOR. DIE MORPHOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE PASSEN ZU EINEM TYPISCHEN KARZINOID (SIEHE ABB. 2 BIS 5). FOTO UND OPERATIONSPRÄPARAT VON HERRN PROF. DR. A. KIRSCHBAUM, UNIVERSITÄTSKLINIKUM MARBURG (UKGM) 2019.	18
ABBILDUNG 2: HISTOLOGISCHES BILD DES IN ABB. 1 DARGESTELLTEN TUMORS IN DER HE-FÄRBUNG IN 12,5-FACHER VERGRÖßERUNG (PATHOLOGISCHES INSTITUT DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG).	19
ABBILDUNG 3: HISTOLOGISCHES PRÄPARAT DES IN ABB. 1 DARGESTELLTEN TUMORS NACH DER ANFÄRBUNG MIT HE IM DETAIL IN 100-FACHER VERGRÖßERUNG (PATHOLOGISCHES INSTITUT DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG).	20
ABBILDUNG 4: HISTOLOGISCHES PRÄPARAT DES OBEN ABGEBILDETEN TUMORS NACH ANFÄRBUNG DES KI-67 ANTIGENS AUF DER ZELLOBERFLÄCHE IN 100-FACHER VERGRÖßERUNG (PATHOLOGISCHES INSTITUT DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG).	21
ABBILDUNG 5: HISTOLOGISCHES PRÄPARAT DES OBIGEN TUMORS NACH IHC-FÄRBUNG GEGEN SYNAPTOPHYSIN IN 100-FACHER VERGRÖßERUNG (PATHOLOGISCHES INSTITUT DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS MARBURG).	22
ABBILDUNG 6: KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVE FOR LUNG NEUROENDOCRINE TUMORS STRATIFIED BY TYPICAL VS ATYPICAL CARCINOID PHENOTYPE (N1/4159). PATIENTS WITH ATYPICAL CARCINOIDS HAD A POORER PROGNOSIS, WITH 10-YEAR SURVIVAL RATES OF 59% COMPARED TO 81% FOR TYPICAL CARCINOIDS ($P < 0.05$) (RAMIREZ ET AL., 2017).	25
ABBILDUNG 7: KAPLAN-MEIER SURVIVAL CURVE FOR LUNG CARCINOIDS STRATIFIED BY KI-67 PROLIFERATIVE INDEX (N1/488). PATIENTS WITH KI-67 VALUES $> 10\%$ HAD A SIGNIFICANTLY WORSE PROGNOSIS THAN PATIENTS WITH KI-67 VALUES $< 10\%$ ($P < 0.05$) (RAMIREZ ET AL., 2017).	26
ABBILDUNG 8: PROGRESSION FROM NORMAL EPITHELIUM TO INVASIVE CARCINOMA GOES THROUGH SEVERAL STAGES (KALLURI ET AL., 2010).....	28
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SHH SIGNALWEGES NACH NIKÈ V. J. A. BÜLLER, SANNE L. ROSEKRANS, JESSICA WESTERLUND, GIJS R. VAN DEN BRINK PHYSIOLOGY PUBLISHED 11 JUNE 2012 VOL. 27 NO. 3, 148-155.	32
ABBILDUNG 10: SCHEMATIC DIAGRAM OF THE SIGNALING PATHWAYS ASSOCIATED WITH SNAIL-INDUCED EMT. AN INTEGRATED AND COMPLEX SIGNALING NETWORK, INCLUDING RTKS, TGF-B, NOTCH, WNT, TNF-A, AND BMPs SIGNALING PATHWAYS, ACTIVATE THE TRANSCRIPTION FACTOR SNAIL, RESULTING IN THE INDUCTION OF EMT. THE EXPRESSION OF SNAIL CAUSES A METABOLIC REPROGRAMMING, CONFERS TUMOR CELLS WITH STEM CELL-LIKE TRAITS, RESISTANCE TO IMMUNOSUPPRESSION, AND PROMOTES TUMOR RECURRENCE AND METASTASIS (WANG ET AL., 2013).	33

ABBILDUNG 11: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER NEGATIVEN KONTROLLFÄRBUNG GEGEN SONIC HEDGEHOG (SHH) BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE (ES LIEGT EINE UNSPEZIFISCHE ANFÄRBUNG DES ALVEOLAR-EPITHELs VOR) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	46
ABBILDUNG 12: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBUNG VON SHH SOWOHL IM ZYTOPLASMA ALS AUCH AN DEN MEMBRANEN BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	47
ABBILDUNG 13: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER NOCH STÄRKEREN ANFÄRBUNG VON SHH BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	47
ABBILDUNG 14: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER POSITIVEN IHC-FÄRBUNG GEGEN PTCH 1 BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	48
ABBILDUNG 15: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBUNG VON PTCH 1 BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	49
ABBILDUNG 16: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER ANFÄRBUNG VON PTCH 1 BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	50
ABBILDUNG 17: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER NEGATIVEN KONTROLLFÄRBUNG GEGEN SMO BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE MIT NUR UNSPEZIFISCHER ANFÄRBUNG DER ALVEOLAR-MAKROPHAGEN IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	51
ABBILDUNG 18: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER POSITIVEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN SMO-ANFÄRBUNG BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. DIE FÄRBEREAKTION DES ZYTOPLASMAS IST IM VERGLEICH ZUR FÄRBUNG BEIM AC ABER SCHWÄCHER AUSGEPRÄGT. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	52
ABBILDUNG 19: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER DEUTLICH STARKEN ZYTOPLASMATISCHEN IHC-ANFÄRBUNG VON SMO BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	53
ABBILDUNG 20: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER NEGATIVEN KONTROLLFÄRBUNG GEGEN SNAIL 1 BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE (GERING UNSPEZIFISCHE FÄRBUNG DER ALVEOLAR-EPITHELIEEN) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	54
ABBILDUNG 21: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER POSITIVEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBUNG VON SNAIL 1 BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) MIT EINER SIGNIFIKANTEN	

MEMBRANÖSEN ANFÄRBUNG IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	55
ABBILDUNG 22: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBUNG VON SNAIL 1 BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. DIE ANFÄRBUNG DES ZYTOPLASMAS UND DER ZELLMEMBRAN IST BEI DIESEM AC IM VERGLEICH ZU DER BEIM TC WESENTLICH AUSGEPRÄGTER SICHTBAR. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	56
ABBILDUNG 23: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER POSITIVEN KONTROLLFÄRBUNG AN DEN MEMBRANEN BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	57
ABBILDUNG 24: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER STARKEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANFÄRBUNG DER MEMBRANÄREN STRUKTUREN MIT EINEM IGG-ANTIKÖRPER VON E-CADHERIN BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	58
ABBILDUNG 25: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER POSITIVEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN MEMBRAN-ANFÄRBUNG VON E-CADHERIN BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	59
ABBILDUNG 26: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER NEGATIVEN KONTROLLFÄRBUNG DER ALVEOLAREN GEGEN TWIST BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	60
ABBILDUNG 27: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN NICHT-ANFÄRBUNG VON TWIST BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (TC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	61
ABBILDUNG 28: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN NICHT-ANFÄRBUNG VON TWIST BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (AC) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	62
ABBILDUNG 29: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER NEGATIVEN KONTROLLFÄRBUNG VON VIMENTIN BEI EINEM GESUNDEN LUNGENGeweBE IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).....	63
ABBILDUNG 30: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN NICHT-ANFÄRBUNG VON VIMENTIN BEI EINEM TYPISCHEN LUNGENKARZINOID (DIE ANGEFÄRBTEN AREALE ENTSPRECHEN DEN GEFÄßWÄNDEN) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	64
ABBILDUNG 31: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER IMMUNHISTOCHEMISCHEN NICHT-ANFÄRBUNG VON VIMENTIN BEI EINEM ATYPISCHEN LUNGENKARZINOID (DIE ANGEFÄRBTEN AREALE ENTSPRECHEN DEN GEFÄßWÄNDEN) IN 200-FACHER VERGRÖßERUNG. (AUS DEM MVZ INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, ZYTOLOGIE UND MOLEKULARPATHOLOGIE WETZLAR).	65

ABBILDUNG 32: AKTIVITÄT DER EMT SIGNALWEGS-EXPRESSION BEI DEN UNTERSUCHTEN NET DER LUNGE.	70
ABBILDUNG 33: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER EINZELNEN SIGNALWEGSAKTIVITÄTEN IM DIREKTEN VERGLEICH VON TYPISCHEN UND ATYPISCHEN LUNGENKARZINOIDEN.....	74
ABBILDUNG 34: WACHSTUMSKURVEN DER ZELLINIE CRL-5815 NACH DER ZUGABE DES SHH-INHIBITORS CYCLOPAMIN IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN.....	76
ABBILDUNG 35: WACHSTUMSKURVEN DER ZELLINIE CRL-5815 UNTER DER ZUGABE VON PEG, IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONSTUFEN.....	77
ABBILDUNG 36: WACHSTUMSKURVEN DER ZELLINIE CRL-5815 UNTER DER ZUGABE DES SNAIL 1- INHIBITORS GN25 IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONSTUFEN.....	78
ABBILDUNG 37: DIE GENAKTIVITÄT DES SHH BEI VERSCHIEDENEN NET DER LUNGE (TUMORSTADIEN S. 4.1) GEGENÜBER DEM VON NORMIERTEM LUNGENGeweBE - BASISLEVEL 1. DIE NUMMERN DER TUMORPROBEN ENTSPRECHEN DEN HISTOLOGIE-NR. DER TABELLE 4.....	80
ABBILDUNG 38: DIE GENAKTIVITÄT VON SNAIL 1 WAR NUR BEI 2 VON 15 UNTERSUCHTEN TUMORPROBEN GEGENÜBER DEM LEVEL VON GESUNDEM LUNGENGeweBE VERSTÄRKT.	81
ABBILDUNG 39: DIE GENAKTIVITÄT VON VIMENTIN GEGENÜBER DEM VON NORMIERTEM LUNGENGeweBE. HIER WAREN 4 VON 20 PROBEN VERSTÄRKT GENAKTIV.....	82

11 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: DIE KLASSIFIKATION DER NET DER LUNGE IN VIER SUBTYPEN (TRAVIS ET AL., 2015).....	11
TABELLE 2: KURZFASSUNG DER TNM-KLASSIFIKATION NEUROENDOKRINER TUMOREN DER LUNGE (WITTEKIND & GRADISTANAC, 2012).....	14
TABELLE 3: WHO-KLASSIFIKATION DER NET DER LUNGE VON 2015 (SCHNABEL & JUNKER, 2015).	16
TABELLE 4: PATIENTENLISTE MIT DEM JEWEILIGEM TUMORSTADIUM, UNTERTEILT IN TC UND AC.	40
TABELLE 5: IMMUNREAKTIVER SCORE (IRS) IN ANLEHNUNG AN REMMELE UND STEGNER (1986).....	44
TABELLE 6: AUFLISTUNG DER UNTERSUCHTEN EMT SIGNALWEGS-EXPRESSION BEIM NET DER LUNGE UND IHR EINFLUSS AUF DIE TUMORENTWICKLUNG.	69
TABELLE 7: AUSWERTUNG DER SIGNALWEGS-AKTIVITÄT BEI TYPISCHEN UND ATYPISCHEN NET MITTELS DER IHC.	71
TABELLE 8: IMMUNREAKTIVER SCORE BEI TYPISCHEN UND ATYPISCHEN NET NACH DER IHC-FÄRBUNG IN ANLEHNUNG AN REMMELE UND STEGNER (1986).....	73

12 Literaturverzeichnis

- Amakye, D., Jagani, Z., Dorsch, M., 2013. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* 19, 1410–1422.
<https://doi.org/10.1038/nm.3389>
- Bauer, A.W., 2004. ["...impossible, to find something specific in it". Rudolf Virchow and tumor pathology]. *Medizinhist. J.* 39, 3—26.
- Begum, N., 2017. Epidemiologische Daten des Deutschen NET-Registers. *TumorDiagnostik Ther.* 38, 30–34. <https://doi.org/10.1055/s-0042-124065>
- Bellet, V., Boissière, F., Bibeau, F., Desmetz, C., Berthe, M.L., Rochaix, P., Maudelonde, T., Mangè, A., Solassol, J., 2008. Proteomic analysis of RCL2 paraffin-embedded tissues. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2027–2036.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00186.x>
- Berx, G., van Roy, F., 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129–a003129.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>
- Bonnichon, A., Le Floch, H., Rivière, F., Margery, J., Vaylet, F., 2010. Neuroendocrine tumours of the lung, in: Belkacémi, Y., Mirimanoff, R.-O., Ozsahin, M. (Eds.), *Management of Rare Adult Tumours*. Springer Paris, Paris, pp. 423–433.
https://doi.org/10.1007/978-2-287-92246-6_48
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., Weinberg, R.A., 2018. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 128–134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
- Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., 2016. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Wiley.

- Büller, N.V.J.A., Rosekrans, S.L., Westerlund, J., van den Brink, G.R., 2012. Hedgehog Signaling and Maintenance of Homeostasis in the Intestinal Epithelium. *Physiology* 27, 148–155. <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2012>
- Caplin, M.E., Baudin, E., Ferolla, P., Filosso, P., Lim, E., Oberg, K., Pelosi, G., Perren, A., Rossi, R.E., Travis, W.D., 2015. European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice 39–43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv041>
- Carballo, G.B., Honorato, J.R., de Lopes, G.P.F., Spohr, T.C.L. de S. e, 2018. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun. Signal.* 16, 11. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7>
- Cardillo, G., Sera, F., Di Martino, M., Graziano, P., Giunti, R., Carbone, L., Facciolo, F., Martelli, M., 2004. Bronchial carcinoid tumors: Nodal status and long-term survival after resection. *Ann. Thorac. Surg.* 77, 1781–1785. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2003.10.089>
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., Beachy, P.A., 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748. <https://doi.org/10.1101/gad.1025302>
- Chou, Y.-S., Yang, M.-H., 2015. Epithelial–mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. *J. Chinese Med. Assoc.* 78, 438–445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.05.002>
- Craven, R.A., Cairns, D.A., Zougman, A., Harnden, P., Selby, P.J., Banks, R.E., 2013. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: Assessment of overall technical variability and the impact of block age. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 7, 273–282. <https://doi.org/10.1002/prca.201200065>

- Dasari, A., Shen, C., Halperin, D., Zhao, B., Zhou, S., Xu, Y., Shih, T., Yao, J.C., 2017. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol.* 3, 1335–1342. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>
- Dengler, J., 2018. Die Inhibition des Transkriptionsfaktors Snail durch PEG und GN25 in Zelllinien des humanen duktales Adenokarzinoms des 1–102.
- Detterbeck, F.C., 2010. Management of Carcinoid Tumors. *Ann. Thorac. Surg.* 89, 998–1005. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.07.097>
- Du, B., Shim, J., 2016. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* 21, 965. <https://doi.org/10.3390/molecules21070965>
- Fazio, N., Buzzoni, R., Delle Fave, G., Tesselaar, M.E., Wolin, E., Van Cutsem, E., Tomassetti, P., Strosberg, J., Voi, M., Bubuteishvili-Pacaud, L., Ridolfi, A., Herbst, F., Tomasek, J., Singh, S., Pavel, M., Kulke, M.H., Valle, J.W., Yao, J.C., 2018. Everolimus in advanced, progressive, well-differentiated, non-functional neuroendocrine tumors: RADIANT-4 lung subgroup analysis. *Cancer Sci.* 109, 174–181. <https://doi.org/10.1111/cas.13427>
- Fendrich, V., Waldmann, J., Esni, F., Ramaswamy, A., Mullendore, M., Buchholz, M., Maitra, A., 2007. Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0108>
- Fendrich, V., Waldmann, J., Feldmann, G., Schlosser, K., König, A., Ramaswamy, A., Bartsch, D.K., Karakas, E., 2009. Unique expression pattern of the EMT markers Snail, Twist and E-cadherin in benign and malignant parathyroid neoplasia. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 695–703. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0662>

- Forde, P.M., Hooker, C.M., Boikos, S.A., Petrini, I., Giaccone, G., Rudin, C.M., Yang, S.C., Illei, P.B., Hann, C.L., Ettinger, D.S., Brahmer, J.R., Kelly, R.J., 2014. Systemic therapy, clinical outcomes, and overall survival in locally advanced or metastatic pulmonary carcinoid: A brief report. *J. Thorac. Oncol.* 9, 414–418. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000065>
- Galván, J.A., Astudillo, A., Vallina, A., Crespo, G., Folgueras, M.V., González, M.V., 2014. Prognostic and diagnostic value of epithelial to mesenchymal transition markers in pulmonary neuroendocrine tumors. *BMC Cancer* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-855>
- Gheldof, A., Berx, G., 2013. Chapter Fourteen - Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition, in: van Roy, F. (Ed.), *The Molecular Biology of Cadherins, Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press, pp. 317–336. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5)
- Giroux-Leprieur, E., Costantini, A., Ding, V.W., He, B., 2018. Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2835. <https://doi.org/10.3390/ijms19092835>
- Gonnissen, A., Isebaert, S., Haustermans, K., 2015. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget*; Vol 6, No 16.
- Granberg, D., Sundin, A., Janson, E.T., Öberg, K., Skogseid, B., Westlin, J.E., 2003. Octreoscan in patients with bronchial carcinoid tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 59, 793–799. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2003.01931.x>
- Gupta, G.P., Massagué, J., 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127, 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>

- Gustafsson, O.J.R., Arentz, G., Hoffmann, P., 2015. Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1854, 559–580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.003>
- Halperin, D.M., Shen, C., Dasari, A., Xu, Y., Chu, Y., Zhou, S., Shih, Y.-C.T., Yao, J.C., 2017. Frequency of carcinoid syndrome at neuroendocrine tumour diagnosis: a population-based study. *Lancet Oncol.* 18, 525–534. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30110-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30110-9)
- Havel, L.S., Kline, E.R., Salgueiro, A.M., Marcus, A.I., 2015. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity. *Oncogene* 34, 1979–1990. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.123>
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S., 2015. EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* 4. <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0048-3>
- Hendifar, A.E., Marchevsky, A.M., Tuli, R., 2017. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J. Thorac. Oncol.* 12, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2222>
- Hobbins, S., West, D., Peake, M., Beckett, P., Woolhouse, I., 2016. Patient characteristics, treatment and survival in pulmonary carcinoid tumours: an analysis from the UK National Lung Cancer Audit. *BMJ Open* 6, e012530. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012530>
- Horner, M.J., 2011. SEER Cancer Statistics Review 1975-2006 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2006 National Cancer Institute. Cancer.

- Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.J., Hotz, H.G., 2007. Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 4769–4776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2926>
- Hwang, J., Kang, M.H., Yoo, Y.A., Quan, Y.H., Kim, H.K., Oh, S.C., Choi, Y.H., 2014. The effects of sonic hedgehog signaling pathway components on non-small-cell lung cancer progression and clinical outcome. *World J. Surg. Oncol.* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-268>
- Im, S., Joo, H., 2013. *Ca Dojke* 116–123.
- Jiang, W.G., Ye, L., Ruge, F., Sun, P.-H., Sanders, A.J., Ji, K., Lane, J., Zhang, L., Satherley, L., Weeks, H.P., Zhi, X., Gao, Y., Wei, C., Wu, Y., Mason, M.D., 2015. Expression of Sonic Hedgehog (SHH) in human lung cancer and the impact of YangZheng XiaoJi on SHH-mediated biological function of lung cancer cells and tumor growth. *Anticancer Res.* 35, 1321–31.
- Kaifi, J.T., Kayser, G., Ruf, J., Passlick, B., 2015. The Diagnosis and Treatment of Bronchopulmonary Carcinoid. *Dtsch Arztebl Int.* 112, 479–485.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2010. The basics of epithelial-mesenchymal transition Find the latest version : Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kase, S., Sugio, K., Yamazaki, K., Okamoto, T., Yano, T., Sugimachi, K., 2000. Expression of E-cadherin and β -catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin. Cancer Res.* 6, 4789–4796.

- Khan, M.A., Chen, H.C., Zhang, D., Fu, J., 2013. Twist: A molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biol.* 34, 2497–2506. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1002-x>
- Kidd, M.E., Shumaker, D.K., Ridge, K.M., 2014. The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50, 1–6. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0314TR>
- Klöppel, G., 2011. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr. Relat. Cancer* 18, S1–S16. <https://doi.org/10.1530/erc-11-0013>
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kroepil, F., Fluegen, G., Totikov, Z., Baldus, S.E., Vay, C., Schauer, M., Topp, S.A., Esch, J.S. am, Knoefel, W.T., Stoecklein, N.H., 2012. Down-Regulation of CDH1 Is Associated with Expression of SNAI1 in Colorectal Adenomas. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046665>
- Kroll, J., Becker, K.F., Kuphal, S., Hein, R., Hofstädter, F., Bosserhoff, A.K., 2008. Isolation of high quality protein samples from punches of formalin fixed and paraffin embedded tissue blocks. *Histol. Histopathol.* 23, 391—395. <https://doi.org/10.14670/hh-23.391>
- Lee, S.-H., Lee, S.-J., Jung, Y.S., Xu, Y., Kang, H.S., Ha, N.-C., Park, B.-J., 2009. Blocking of p53-Snail Binding, Promoted by Oncogenic K-Ras, Recovers p53 Expression and function. *Neoplasia* 11, 22-IN6. <https://doi.org/10.1593/NEO.81006>

- Lee, T.K., Poon, R.T.P., Yuen, A.P., Ling, M.T., Kwok, W.K., Wang, X.H., Wong, Y.C., Guan, X., Man, K., Chau, K.L., Fan, S.T., 2006. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin. Cancer Res.* 12, 5369–5376.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2722>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, A., 2018. Leitlinienprogramm Onkologie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, AWMF-Registernummer: 020/007QL 1–417.
<http://leitlinienprogrammonkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html> (Zugriff am: TT.MM.JJJJ)
- Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J., Wang, Y.-K., 2015. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 6.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>
- Mann, H.B., Whitney, D.R., 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Stat.* 18, 50–60.
<https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>
- Mayer, J.M., Schwarz, N.T., 2017. 22 Neuroendokrine Tumoren und gastrointestinale Stromatumoren, in: Schwarz, N.T. (Ed.), *Allgemein- Und Viszeralchirurgie Essentials*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-0037-145446>
- Melosky, B., 2018. Advanced typical and atypical carcinoid tumours of the lung : management recommendations 25, 86–93.
- Modlin, I.M., Lye, K.D., Kidd, M., 2003. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97, 934–959. <https://doi.org/10.1002/cncr.11105>

- Moody, S.E., Perez, D., Pan, T.C., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., Chodosh, L.A., 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.009>
- Nakamura, R., Ishii, H., Endo, K., Hotta, A., Fujii, E., Miyazawa, K., Saitoh, M., 2018. Reciprocal expression of slug and snail in human oral cancer cells. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199442>
- Nicolson, G.L., 1984. Tumor progression, oncogenes and the evolution of metastatic phenotypic diversity. *Clin. Exp. Metastasis* 2, 85–105. <https://doi.org/10.1007/BF00052411>
- Noel-Savina, E., Descourt, R., 2013. Focus on treatment of lung carcinoid tumor. *Onco. Targets. Ther.* 6, 1533–1537. <https://doi.org/10.2147/OTT.S32464>
- Oberndorfer, S., 1907. Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol* 1, 426–429.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A., 2008. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* 68, 3645 LP – 3654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>
- Oronsky, B., Ma, P.C., Morgensztern, D., Carter, C.A., 2017. Nothing But NET : A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. *Neoplasia* 19, 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.09.002>

- Pěa, C., García, J.M., Larriba, M.J., Barderas, R., Gómez, I., Herrera, M., García, V., Silva, J., Domínguez, G., Rodríguez, R., Cuevas, J., De Herreros, A.G., Casal, J.I., Muñoz, A., Bonilla, F., 2009. SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. *Oncogene* 28, 4375–4385. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.285>
- Pelosi, G., Pattini, L., Morana, G., Fabbri, A., Faccinetto, A., Fazio, N., Valeri, B., Sonzogni, A., 2016. Grading lung neuroendocrine tumors: Controversies in search of a solution. *Histol. Histopathol.* 32, 11822. <https://doi.org/10.14670/HH-11-822>
- Pelosi, G., Sonzogni, A., Harari, S., Albini, A., Bresaola, E., Marchiò, C., Massa, F., Righi, L., Gatti, G., Papanikolaou, N., Vijayvergia, N., Calabrese, F., Papotti, M., 2017. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl. Lung Cancer Res.* Vol 6, No 5 (October 2017) *Transl. Lung Cancer Res.* (Update Pathol. Predict. Biomarkers Lung Cancer).
- Pernick, N., n.d. PathologyOutlines.com [WWW Document]. URL <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsvimentin.html>
- Prosch, H., 2017. Pulmonale KarzinoidePulmonary carcinoid tumors. *Radiologe* 57, 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00117-017-0243-x>
- Pusceddu, S., Verzoni, E., Prinzi, N., Mennitto, A., Femia, D., Grassi, P., Concas, L., Vernieri, C., Lo Russo, G., Procopio, G., 2017. Everolimus treatment for neuroendocrine tumors: latest results and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 9, 183–188. <https://doi.org/10.1177/1758834016683905>
- Rahnama, F., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G., 2004. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem. J.* 378, 325–334. <https://doi.org/10.1042/bj20031200>

- Ramirez, R.A., Uhlhorn, A.-P., Ryan, P., Beyer, D.T., Diebold, A.E., Voros, B.A., Chester, M.M., Wang, Y.-Z., Boudreaux, J.P., Woltering, E.A., Campeau, R.J., Anthony, L.B., 2017. Prognostic factors in typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ochsner J.* 17, 335–340. <https://doi.org/10.1043/TOJ-17-0030>
- Raz, G., Allen, K.E., Kingsley, C., Cherni, I., Arora, S., Watanabe, A., Lorenzo, C.D., Edwards V, D.K., Sridhar, S., Hostetter, G., Weiss, G.J., 2012. Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 76, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.10.015>
- Rea, F., Rizzardi, G., Zuin, A., Marulli, G., Nicotra, S., Bulf, R., Schiavon, M., Sartori, F., 2007. Outcome and surgical strategy in bronchial carcinoid tumors: single institution experience with 252 patients. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* 31, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2006.10.040>
- Remmele, W., Stegner, H.-E., 1986. Immunohistochemischer Nachweis von \square strogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe: *Dtsch Arztebl Int.* 83, A-3362-A-3364.
- Riedlinger, D., Bahra, M., Boas-Knoop, S., Lippert, S., Bradtmöller, M., Guse, K., Seehofer, D., Bova, R., Sauer, I.M., Neuhaus, P., Koch, A., Kamphues, C., 2014. Hedgehog pathway as a potential treatment target in human cholangiocarcinoma. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* 21, 607–615. <https://doi.org/10.1002/jhbp.107>
- Righi, L., Gatti, G., Volante, M., Papotti, M., 2017. Lung neuroendocrine tumors: Pathological characteristics. *J. Thorac. Dis.* 9, S1442–S1447. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.01.59>
- Rimkus, T.K., Carpenter, R.L., Qasem, S., Chan, M., Lo, H., 2016. cancers Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway : Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel).* 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers8020022>

Rinke, A., Gress, T.M., Albert, J., Alfke, H., Amthauer, H., Anlauf, M., Arnold, R., Baum, R., Denecke, T., Ezziddin, S., Fendrich, V., Gniffke, S., Haug, A., Hörsch, D., Kegel, T., Knoefel, W.T., Knösel, T., Kratochwil, C., Lahner, H., Lordick, F., Luster, M., Mahnken, A., Mellar, K., Mönig, H., Musholt, T.J., Nothacker, M., Pape, U.F., Pascher, A., Pöppel, T., Prasad, V., Probst, A., Scheidhauer, K., Schneider, D., Schott, M., Schrader, J., Seufferlein, T., Sipos, B., Spitzweg, C., Steinmüller, T., Trumm, C., Wurst, C., Zorger, N., 2018. Practice guideline neuroendocrine tumors: AWMF-Reg021-27. *Z. Gastroenterol.* 56, 583–681. <https://doi.org/10.1055/a-0604-2924>

Roche, J., 2018. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*. 10, 52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>

Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., Postigo, A., 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3429–3456. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1122-2>

Sari, I.N., Phi, L.T.H., Jun, N., Wijaya, Y.T., Lee, S., Kwon, H.Y., 2018. Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells* 7, 208. <https://doi.org/10.3390/cells7110208>

Satelli, A., Li, S., 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3033–3046. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>

Savani, M., Guo, Y., Carbone, D.P., Csiki, I., 2012. Sonic hedgehog pathway expression in non-small cell lung cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 4, 225–233. <https://doi.org/10.1177/1758834012450362>

- Schnabel, P., Junker, K., 2015. [Pulmonary neuroendocrine tumors in the new WHO 2015 classification : Start of breaking new grounds?]. *Pathologie* 36. <https://doi.org/10.1007/s00292-015-0030-2>
- Seyedmajidi, M., Seifi, S., Moslemi, D., Mozaffari, S.-F., Gholinia, H., Zolfaghari, Z., 2018. Immunohistochemical expression of TWIST in oral squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic factors. *J. Cancer Res. Ther.* 14, 964. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.224350>
- Shaffer, C.B., Critchfield, F.H., Nair, J.H., 1950. The absorption and excretion of a liquid polyethylene glycol. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* 39, 340—344. <https://doi.org/10.1002/jps.3030390613>
- Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., McCormick, F., Gatalica, Z., Xie, J., 2004. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol. Cancer* 3, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-29>
- Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., Serman, L., 2018. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn. J. basic Med. Sci.* 18, 8–20. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2756>
- Speel, D.R.A.S.M.R.S.M.H.C.J.P.C.S.S.M.V.F.C.S.R.E.J.M., 2016. Limited additive value of the Ki-67 proliferative index on patient survival in World Health Organization-classified pulmonary carcinoids 70.
- Stathis, A., Hess, D., von Moos, R., Homicsko, K., Griguolo, G., Joerger, M., Mark, M., Ackermann, C.J., Allegrini, S., Catapano, C. V, Xyrafas, A., Enoiu, M., Berardi, S., Gargiulo, P., Sessa, C., (SAKK), for the S.G. for C.C.R., 2017. Phase I trial of the oral smoothened inhibitor sonidegib in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* 35, 766–772. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0454-z>

- Stemmler, M.P., Hecht, A., Kinzel, B., Kemler, R., 2003. Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Dev. Dyn.* 227, 238–245. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10301>
- Steuer, C.E., Behera, M., Kim, S., Chen, Z., Saba, N.F., Pillai, R.N., Owonikoko, T.K., Khuri, F.R., Ramalingam, S.S., 2015. Atypical Carcinoid Tumor of the Lung: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Database Analysis. *J. Thorac. Oncol.* 10, 479–485. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000419>
- Sundin, A., Vullierme, M., Kaltsas, G., Plöckinger, U., 2009. ENETS Guidelines
ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors : Radiological Examinations Related Articles :
- Tolani, B., Hoang, N.T., Acevedo, L.A., Giroux Leprieur, E., Li, H., He, B., Jablons, D.M., 2018. Preclinical characterization of therapeutic antibodies targeted at the carboxy-terminus of Sonic hedgehog. *Oncotarget*; Vol 9, No 18.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M., Beasley, M.B., Chirieac, L.R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D.B., Geisinger, K., Hirsch, F.R., Ishikawa, Y., Kerr, K.M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C.A., Tsao, M.S., Wistuba, I., 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1243–1260.
<https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000630>
- Travis, W.D., Organization, W.H., Cancer, I.A. for R. on, Cancer, I.A. for the S. of L., Pathology, I.A. of, 2004. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, IARC WHO Classification of Tumours Series. IARC Press.
- Vesterinen, T., Mononen, S., Salmenkivi, K., Mustonen, H., Ilonen, I., Knuuttila, A., Haglund, C., Arola, J., 2018. Clinicopathological indicators of survival among patients with pulmonary carcinoid tumor. *Acta Oncol. (Madr).* 57, 1109–1116.
<https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1441543>

- Von Hoff, D.D., LoRusso, P.M., Rudin, C.M., Reddy, J.C., Yauch, R.L., Tibes, R., Weiss, G.J., Borad, M.J., Hann, C.L., Brahmer, J.R., Mackey, H.M., Lum, B.L., Darbonne, W.C., Marsters, J.C., de Sauvage, F.J., Low, J.A., 2009. Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 1164–1172. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905360>
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., Zhou, B.P., 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 963–972. <https://doi.org/10.2174/15680096113136660102>
- Warth, T.Z.K.H.S.G.S.H.A.S., 2012. Phenotyping of pulmonary carcinoids and a Ki-67-based grading approach 460, 299–308. <https://doi.org/10.3322/caac.20073>
- Wittekind, C., Gradistanac, T., 2012. Aktuelle TNM-Klassifikationen neuroendokriner Tumoren. *Der Onkol.* 18, 815–824. <https://doi.org/10.1007/s00761-012-2331-x>
- Wolin, E.M., 2015. Challenges in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors of the Lung (Typical and Atypical Carcinoid): Current Status and Future Considerations. *Oncologist* 20, 1123–1131. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0198>
- Wushou, A., Hou, J., Zhao, Y.J., Shao, Z.M., 2014. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 21621–21630. <https://doi.org/10.3390/ijms151221621>
- Yamashita, N., Tokunaga, E., Inoue, Y., Tanaka, K., Nakashima, Y., 2015. Clinical significance of co-expression of E-cadherin and vimentin in invasive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 33, 9518. <https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15>

- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A., 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Yao, J.C., Fazio, N., Singh, S., Buzzoni, R., Carnaghi, C., Wolin, E., Tomasek, J., Raderer, M., Lahner, H., Voi, M., Pacaud, L.B., Rouyrre, N., Sachs, C., Valle, J.W., Fave, G.D., Van Cutsem, E., Tessaar, M., Shimada, Y., Oh, D.-Y., Strosberg, J., Kulke, M.H., Pavel, M.E., 2016. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 387, 968–977. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00817-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00817-X)
- Yao, J.C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J.E., Abdalla, E.K., Fleming, J.B., Vauthey, J.-N., Rashid, A., Evans, D.B., 2008. One Hundred Years After “Carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* 26, 3063–3072. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4377>
- Yoo, Y.A., Kang, M.H., Lee, H.J., Kim, B., Park, J.K., Kim, H.K., Kim, J.S., Oh, S.C., 2011. Sonic Hedgehog Pathway Promotes Metastasis and Lymphangiogenesis via Activation of Akt, EMT, and MMP-9 Pathway in Gastric Cancer. *Cancer Res.* 71, 7061 LP – 7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1338>
- Yuste, M.G., Matilla, J.M., Cañizares, M.A., Molins, L., Guijarro, R., and Thoracic Surgery (EMETNE-SEPAR), M. of the S.M.S., 2017. Surgical treatment of low and intermediate grade lung net. *J. Thorac. Dis.* Vol 9, Suppl. 15 (November 2017) *J. Thorac. Dis.* [Thoracic (Lung & Thymic) Neuroendocr. Tumors].
- Zeng, J., Zhan, P., Wu, G., Yang, W., Liang, W., Lv, T., Song, Y., 2015. Prognostic value of Twist in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res* 4, 236–241. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.04.06>

Zhang, R., Zhang, P., Wang, H., Hou, D., Li, W., Xiao, G., Li, C., 2015. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial–mesenchymal transition of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 262.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0249-0>

13 Liste der Akademischen Lehrer

Prof. Dr. Detlef K. Bartsch	Dr. Christian Mayer
Prof. Dr. Erika Baum	Prof. Dr. Roland Moll
Prof. Dr. Anette Becker	Prof. Dr. Rainer Moosdorf
Prof. Dr. Katja Becker	Prof. Dr. Ulrich Müller
Prof. Dr. Siegfried Bien	Prof. Dr. Andreas Neubauer
Prof. Dr. Alexander Brehm	Prof. Dr. Bernhard Neumüller
Prof. Dr. Yalcin Cetin	Prof. Dr. Christopher Nimsky
Prof. Dr. Frank Czubayko	Prof. Dr. Wolfgang Hermann Oertel
Prof. Dr. Jürgen Daut	Prof. Dr. Sven Opitz
Prof. Dr. Dr. Reinhard B. Dettmeyer	Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher
Prof. Dr. Richard Dodel	Prof. Dr. Timothy David Plant
Prof. Dr. Donner-Banzhoff	PD Dr. Regina Preisig-Müller
Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic	PD Dr. Jens-Peter Reese
Prof. Dr. Volker Fendrich	Prof. Dr. Harald Renz
Dr. Beate Feuser	Prof. Dr. Gerd Richter
PD Dr. Barbara Fritz	Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann	Prof. Dr. Helmut Schäfer
Prof. Dr. Christian Görg	Prof. Dr. Bernhard Schieffer
Prof. Dr. Michael Hertl	PD Dr. Carola Seifart
Prof. Dr. Rainer Hofmann	Prof. Dr. Walter Sekundo
Prof. Dr. Joachim Hoyer	Dr. Selim Sevinc
Prof. Dr. Dr. Peter Herbert Kann	PD Dr. Frank Sommer
Prof. Dr. Tilo Kircher	Prof. Dr. Gerhard Schratt
Prof. Dr. Andreas Kirschbaum	Prof. Dr. Afshin Teymoortash
Prof. Dr. Klaus Jochen Klose	Prof. Dr. Kati Thieme
Prof. Dr. Ulrich Köhler	Prof. Dr. Claus Vogelmeier
Prof. Dr. Roland Lill	Prof. Dr. Uwe Wagner
Prof. Dr. Michael Lohoff	PD Dr. Jens Waldmann
Prof. Dr. Markus Luster	Prof. Dr. Eberhard Weihe
Prof. Dr. Andreas H. Mahnken	Prof. Dr. Jochen Werner
Prof. Dr. Rolf Felix Maier	Prof. Dr. Hinnerk Wulff

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschbaum und meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Meyer, für ihre hervorragende Betreuung und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung der gesamten Arbeit, sowie Frau Dr. Inga Boeck aus dem ÜGP-MVZ Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie in Wetzlar, die mir bei der Analyse und Auswertung meiner immunhistochemischen Präparate beratend zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich von ganzen Herzen bei all denjenigen bedanken, die stets meine neusten Entwürfe und Ideen Korrektur gelesen haben. Danke für all eure Geduld und Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre ermutigenden Worte und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.